



Perturbation de la fonction thyroïdienne : mise en place d'une stratégie de criblage des produits chimiques

Constantin Dallot

► To cite this version:

Constantin Dallot. Perturbation de la fonction thyroïdienne : mise en place d'une stratégie de criblage des produits chimiques. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4135 . tel-01358727

HAL Id: tel-01358727

<https://theses.hal.science/tel-01358727>

Submitted on 1 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS, UFR SCIENCES

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

THÈSE DE DOCTORAT

Perturbation de la fonction thyroïdienne :

Mise en place d'une stratégie de criblage des produits chimiques

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université Nice Sophia Antipolis

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Par Constantin Dallot

Présentée et soutenue publiquement le 17 Décembre 2015 devant le jury composé de :

Pr. Saadia Kerdine-Römer	Rapporteur
Dr. Patrick Balaguer	Rapporteur
Pr. André Guillouzo	Examineur
Pr. Anny Cupo	Directeur
Dr. Christine Risso-de Faverney	Examineur

Résumé

En dépit de l'intérêt croissant pour mesurer les effets de la perturbation thyroïdienne chez l'humain et identifier les produits chimiques environnementaux qui en sont responsables, les moyens d'évaluation disponibles visant à cribler de manière précoce cette perturbation thyroïdienne restent insuffisants et imparfaits. En effet, les mécanismes d'action des produits chimiques à effet toxique pour la fonction thyroïdienne sont multiples et constituent autant d'événements initiateurs pour ce type de perturbation. Dans un contexte réglementaire, cela implique l'utilisation de nombreux tests *in vitro* ciblant chacun l'un de ces mécanismes ou des tests *in vivo* pour une évaluation des effets à plus long terme.

Dans le cadre de cette thèse, trois modèles d'étude ont ainsi été choisis pour permettre un criblage précoce de la perturbation de la fonction thyroïdienne, et à terme une simplification des procédures de criblage préconisées au niveau réglementaire grâce à la réduction du nombre de tests à conduire pour couvrir l'ensemble des mécanismes d'action connus pour causer une perturbation de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (HPT).

Le premier modèle d'étude qui a été proposé, permettant d'identifier les toxiques thyroïdiens, est un modèle *in vivo* d'exposition à court terme (durant 7 jours) et par voie orale chez le rat mâle adulte. Avec ce modèle, le profil d'expression d'une sélection de transcrits de gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne s'est avéré différent chez les rats exposés pendant 7 jours à des toxiques thyroïdiens connus [le Propylthiouracil, le Methimazole, et l'Amitrole qui inhibent la thyroperoxydase; l'Iodure de Sodium, l'Iofensulfone, et l'Amiodarone qui libèrent de l'iode en excès; le Perchlorate de Sodium qui inhibe l'incorporation de l'iode au sein de la thyroïde et le Carbonate de Lithium qui perturbe le transport transcellulaire] et chez les rats exposés à des composés sans action connue sur l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (HPT) [Iprodione et Atrazine]. Le suivi du profil d'expression de transcrits de gènes permet de réaliser un criblage à des doses sub-toxiques de la capacité de composés inconnus à agir directement sur l'axe HPT, après 7 jours d'exposition seulement. L'utilisation des paramètres toxicologiques classiques, tels

l'histologie ou les dosages hormonaux, imposent souvent la conduite d'études de plus longue durée.

Le second modèle d'étude qui a été retenu pour ce travail est la lignée cellulaire PCCl3 de thyrocytes de rats, identifiée comme un modèle potentiel pour le criblage de la toxicité thyroïdienne. En effet, les profils d'expression d'une sélection de transcrits de gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes ou dans la prolifération des thyrocytes, (Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1, et Gtse1) se sont avérés régulés à la hausse dans les cellules PCCl3 exposées à des toxiques thyroïdiens (Propylthiouracil, Methimazole, Iodure de Sodium, ou Perchlorate de Sodium) tandis que ces profils étaient non affectés ou régulés à la baisse dans les cellules PCCl3 exposées à des composés sans action connue sur l'axe HPT (Céfuroxime, Iprodione et Atrazine).

Enfin, les résultats de ce travail ont confirmé qu'un modèle d'hépatocytes cryopréservés (Liverbeads™) pouvait être utilisé pour identifier les inducteurs d'enzymes hépatiques (UDP-GT) responsables chez le rat d'une toxicité thyroïdienne secondaire, associée à une augmentation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes.

Le travail présenté dans cette thèse a permis d'identifier trois modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* utilisables lors des tests de criblage pour l'identification précoce de la perturbation de la fonction thyroïdienne. L'évaluation de cette perturbation est rendu possible grâce à l'utilisation de profils d'expression d'une sélection de transcrits de gènes, comme principal ou unique paramètre d'étude.

Mots clés

Thyroïde ; toxicologie ; perturbateurs endocriniens ; screening / criblage ; expression génique, culture cellulaire, PCCl3, Liverbeads, Rat.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du jury de cette thèse, dont les rapporteurs le professeur Saadia Kerdine-Römer, le docteur Patrick Balaguer, et le professeur André Guillouzo qui ont accepté de travailler sur ce manuscrit dans des délais réduits, et de faire le déplacement jusqu'en pays niçois je leur en suis très reconnaissant.

Un grand merci également aux personnes qui ont participé à l'encadrement de la thèse, Anny Cupo, Olivier Blanck, et Christine Risso et qui ont su donner de leur temps pour me transmettre connaissances et méthodologie me permettant d'avancer dans mes travaux et de m'armer pour mon avenir

Je suis très reconnaissant envers Rémi Bars, directeur du service de recherche du centre de toxicologie de Bayer CropScience, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe durant quatre ans et donné la formidable opportunité de me former à la recherche.

Je remercie toutes les personnes du centre de toxicologie de Bayer CropScience. J'ai vraiment apprécié mon environnement de travail durant ces quatre années et j'y ai découvert de très belles personnes. J'ai une pensée particulière pour mes collègues de l'équipe recherche. Je ne vous oublie pas Anne, mon alter ego thésard de l'équipe, Mapie, Nicole, Ainhoa, Hélène, Marie-France, les sympathiques stagiaires Mélissa et Benjamin, et tous les autres.

Merci à Helen Tinwell et David Rouquié pour vos conseils judicieux donnés régulièrement sans être directement impliqués dans le projet Vos regards extérieurs m'ont évité bien des errances.

Je remercie ma famille et mes amis de leur patience, je n'ai pas toujours été disponible ces trois dernières années.

Merci à Victorine de m'avoir soutenu et épaulé au quotidien.

Enfin, merci à vous Taleh et Judicaëlle, mes enfants, vous qui êtes nés pendant cette thèse. Vous avez égayé même les moments de doute les plus durs. Si vous avez malgré vous quelque peu corsé le défi que représente une thèse, vous n'en avez rendu l'histoire que plus belle !

Table des matières

Résumé	3
Mots clés	4
Liste des abréviations	13
Liste des illustrations	15
Liste des tableaux	17
I. Contexte et objectifs du projet de thèse	19
II. Les grands axes de la régulation hormonale	25
A. Les perturbateurs endocriniens et la thyroïde	25
B. Axe hypothalamus-hypophyse-gonades (HPG)	32
1. Les hormones stéroïdiennes sexuelles	32
2. Conséquences de la perturbation des hormones sexuelles	34
C. Axe hypothalamus-hypophyse-surrénales (HPA)	35
1. Les glucocorticoïdes	37
2. Les minéralocorticoïdes	38
3. Les hormones stéroïdes sexuelles surrénaliennes	38
4. La perturbation de l'axe HPA	39
D. Voie de signalisation des acides rétinoïques	41
1. Voie de signalisation du récepteur RAR	41
2. Voie de signalisation du récepteur RXR	41
3. La perturbation de la voie de signalisation des acides rétinoïques	42
E. Voie de signalisation de la vitamine D	43
1. Description	43
2. Perturbations de la voie de signalisation de la vitamine D	44
F. Voie de signalisation du récepteur PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)	45
1. Les récepteurs PPAR	45
2. Perturbation de la voie de signalisation du récepteur PPAR	47
III. Axe hypothalamus-Hypophyse-Thyroïde (HPT), Physiologie	51

A.	Description de l'axe HPT	51
B.	La glande thyroïde : anatomie & organisation fonctionnelle.....	56
C.	La perturbation de l'axe HPT	60
1.	Perturbation de la signalisation de la TRH et de la TSH	62
2.	Toxicité directe sur la glande thyroïde.....	63
3.	Perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes	63
4.	Perturbation du transport transmembranaire des hormones thyroïdiennes.....	64
5.	Interactions avec les déiodinases périphériques	64
6.	Altération de la réponse par action sur les organes cibles des hormones thyroïdiennes	64
7.	Métabolisme des hormones thyroïdiennes	65
8.	Conclusion	66
IV.	<i>Le criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne : état de l'art et perspectives</i>	69
A.	Un exemple de batterie de tests : le criblage de la perturbation des hormones sexuelles	70
1.	Tests <i>in vitro</i>	72
2.	Tests <i>in vivo</i>	73
3.	Conclusion	77
B.	Tests de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne	78
1.	Évaluation de l'intégrité de la signalisation centrale	79
2.	Mise en évidence de la perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes	81
3.	Détection de la perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes	82
4.	Métabolisme et excrétion	84
5.	Transport transmembranaire des hormones thyroïdiennes.....	87
6.	Effet des hormones thyroïdiennes médié par le récepteur TR	88
7.	Tests intégrant des modes d'actions multiples	91
8.	Conclusion	94
V.	<i>Screening Thyroid Effects using standard and molecular tools in 7-day Adult Male Rat toxicity Studies</i>	97
	<i>Authors</i>.....	97
	<i>Keywords</i>.....	97
	<i>Abbreviations</i>	97

Abstract	99
A. Introduction	99
B. Materials and Methods	106
Ethical statement.	106
Animal Housing and treatment.	107
Dosing and experimental design.	107
Histopathology of thyroid gland.....	108
Hormone measurements	109
Gene transcript measurements	109
Statistical analyses.	110
C. RESULTS	110
1. Macroscopic examination	110
2. Microscopic examination	112
3. Effect of chemicals on circulating T ₃ , T ₄ , and TSH levels	114
4. Thyroid gland gene expression (qPCR).....	117
D. Discussion	128
1. Circulating hormone dosage and microscopic examination of the thyroid gland are not sufficient to identify thyroid toxicants in 7-days male rat studies.....	129
2. Expression of a selection of genes was selectively affected by treatment with thyroid toxicants affecting the thyroid hormone synthesis	131
3. Relevance of a 7-day male rat <i>in vivo</i> screening assay.....	134
4. Further investigation on the 7-day model.	135
E. Conclusion.....	135
References.....	137
VI. Screening thyroid toxicity using gene expression in the PCCL3 rat thyroid cell line	157
Authors.....	157
Keywords.....	157
Abstract	157
A. Introduction	158
B. Materials and Methods	163

Cell culture and treatment.	163
Gene transcript measurements.	166
Statistical analyses.	167
C. RESULTS	167
1. <i>The influence of passage number on the morphological development of PCCl3cells</i>	167
2. The influence of cell passage number and TSH concentration added to cell culture medium, on mRNA levels of candidate genes (Fig.2)	169
3. Effects of 0.1% DMSO on mRNA levels of candidate genes after 72hours	172
4. Cytotoxic analysis of the tested chemical compounds.	173
5. Changes in the expression of a set of six genes were observed in PCCl3 cultures exposed for 24h to known thyroid toxicants (PTU, MMI, Nal, NaClO4) and other compounds having no known thyroid-disrupting effect (IPR, ATZ and CEF).	173
D. Discussion	176
1. A selection of set of genes was selectively affected by treatment with thyroid-specific- and -nonspecific toxicants.	177
2. Characterization of cell culture condition for screening of thyroid toxicity	180
3. Relevance of a PCCl3-based in vitro screening assay for thyroid toxicity.	182
4. Further investigations on the screening molecular-based in vitro assay.	183
E. Conclusion.....	184
References.....	186
 VII. <i>Criblage de la toxicité thyroïdienne médiée par l'induction d'enzymes hépatiques</i>	 207
A. Aperçu du mécanisme mis en jeu chez le rongeur	207
B. Un mécanisme non extrapolable à l'homme	208
C. La toxicité thyroïdienne médiée par le foie en détails.....	210
1. La réaction de glucuronidation	211
2. Les isoformes d'UGT impliquées	212
3. L'induction des enzymes hépatiques à l'origine de l'activation de l'axe HPT	213
D. Quel modèle pour le criblage des substances « Phenobarbital-like » ?.....	213
E. Etude de la pertinence du modèle Liverbeads pour la détection des composés « Phenobarbital-like »	217
1. Matériel et méthodes	218

2. Résultats.....	219
3. Discussion.....	222
4. Conclusion	224
VIII. Discussion Générale	225
A. Études <i>in vivo</i> court terme sur rat, un modèle utilisable en routine ?.....	226
1. Un nouvel outil pour la détection des PE toxiques directs vis-à-vis de la thyroïde	226
2. Toxicité thyroïdienne médiée par le foie	228
3. Perturbations des transports transmembranaires et sanguins des hormones thyroïdiennes et interactions avec les déiodinases	229
4. Bilan.....	230
B. Identification d'une combinaison de modèles d'étude <i>in vitro</i> de la perturbation de la fonction thyroïdienne	230
1. La lignée cellulaire PCCl3, un modèle pertinent pour le criblage des différents mécanismes de toxicité directe vis-à-vis de la glande thyroïde.....	231
2. Le modèle Liverbeads™ validé pour sa capacité à cribler les inducteurs des UGT toxiques thyroïdiens chez le rongeur.....	234
3. Transport sanguin & déiodation	237
4. Batterie de tests <i>in vitro</i> proposée.....	238
IX. Conclusion & perspectives	240
Références	243
Annexe : Revue de littérature concernant les tests <i>in vitro</i> et <i>in vitro</i> rapides existants	266

Liste des abréviations

11 β -HSD2 : 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase de type 2
ACTH : corticotrophine
AhR : Arylhydrocarbon Receptor
AMT : Aminotriazole,
AMI : Amiodarone
AR : Récepteur aux androgènes
ATZ : Atrazine
AND : androstenedione
ANSA : Acide 8-aniline naphtalène sulfonique
AVP : Vasopressine
BPA : Bisphénol A
CAR : Constitutive Androstane Receptor
CEF : Céfuroxime
CYP : Cytochromes P450
CRH : Hormone permettant la libération de la corticotrophine
DES : diethylstilbestrol
DHEA : dihydroepiandrostérone
DHEA : dihydroepiandrostérone Sulfate
EDSP : Endocrine Disruptors Screening Program
EPA : (US) Environmental Protection Agency
ER : Récepteur aux œstrogènes
FXR : Farnesoid X Receptor
HDL : High Density Lipoprotein
HPA : Hypothalamus-hypophyse-surrénales
HPG : Hypothalamus-hypophyse-gonades
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
HPT : Hypothalamus-hypophyse-thyroïde
IAMRSA : Intact Adult Male Rat Screening Assay
IL : Interleukine
IOF : Iofensulfon
IPR : Iprodione
LiCO₃ : Lithium Carbonate
KO : Knock-out
LC-MS : chromatographie liquide – spectrographie de masse
LDL : Low Density Lipoprotein
LXR : Liver X Receptor
MCT : Monocarboxylase Transporter
MEI : Microsomal Enzyme Inducer
MIE : Molecular Initiating Event
MMI : Methimazole OATP : Organic Anion Transporter Protein
NaClO₄ : Sodium Perchlorate
NaI : Sodium Iodide

OCDE : Organisation pour la coordination et le développement économique
OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development
PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide
PE : perturbateur endocrinien
PBDE : polybromodiphenylether
PCB : Polychlorinated Biphenyls
PCDD : Polychlorinated dibenzo-p-dioxins
PCDF : Polychlorinated Dibenzofurans
PCR : Polymerase Chain Reaction
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTU : Propylthiouracile
PXR : Pregnane X Receptor
RAR : Retinoic acid Receptor
RXR : Retinoid X Receptor
SIADH : syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone anti-diurétique
SULT : Sulfotransférase
T₃ : Triiodothyronine
T₄ : Thyroxine
TBG : Thyroxin Binding Globulin
TBT : Tributylétain
TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TH: Thyroid Hormone
THDC : Thyroid Hormone Disrupting Compound
TPO: Thyroperoxydase
TR : Thyroid Hormone Receptor
TSH: Thyrotropin or Thyroid Stimulating Hormone
TTR : Transthyrétine
UDP-GT : UDP-Glucuronosyltransférase
UGT : UDP-Glucuronosyltransférase
US-EPA : (US) Environmental Protection Agency
VDR : Vitamin D Receptor
VDRE : Vitamin D Responsive Element
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
ZF : Zona fasciculata
ZG : zona glomerulosa
ZR : Zona reticularis

Liste des illustrations

<i>Figure II-1. Les glandes endocrines et leurs produits de sécrétion.</i>	31
<i>Figure II-2. Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades.</i>	33
<i>Figure II-3. Stéroïdogénèse surrénalienne.</i>	37
<i>Figure II-4. Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien (HPA).</i>	38
<i>Figure III-1. Représentation schématique de l'axe HPT.</i>	53
<i>Figure III-2. Action des déiodinases sur les hormones thyroïdiennes.</i>	55
<i>Figure III-3 : Follicule thyroïdien.</i>	57
<i>Figure III-4. Processus d'élaboration des hormones thyroïdiennes à partir de MIT et DIT.</i>	58
<i>Figure III-5. Représentation schématique de la synthèse des hormones thyroïdiennes.</i>	59
<i>Figure III-6. Relation entre l'action des hormones thyroïdiennes et le développement du cerveau.</i>	61
<i>Figure IV-1. Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.</i>	72
<i>Figure V-1. Histological appearance of the thyroid from a control rat, from a rat of the high-dose PTU, MMI, or AMT group rat.</i>	113
<i>Figure V-2. Effect of treatment on the proliferation of thyrocytes.</i>	114
<i>Figure V-3. Effect of treatment on total blood T₃ (top), T₄ (middle), and TSH (bottom) concentration in rats ...</i>	116
<i>Figure V-4.. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in thyroid hormone synthesis regulation.</i>	118
<i>Figure V-5. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in cell cycle regulation / cell death / cell proliferation / tumor genesis / or used as tumor marker</i>	122
<i>Figure V-6 Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in cell signaling and in signal transduction.</i>	125
<i>Figure V-7. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes coding for thyroid transcription factors.</i>	127
<i>Figure VI-1. Phase contrast microscopy of PCCl3 cells in culture</i>	168
<i>Figure VI-2. Effect of DMSO on relative quantities of transcripts of a selection of genes.</i>	172
<i>Figure VI-3. Effect of treatment on relative quantities of gene transcripts.</i>	175
<i>Figure VII-1. Mécanisme de toxicité vis-à-vis de la thyroïde des inducteurs d'enzymes hépatiques chez les rongeurs..</i>	208
<i>Figure VII-2. Effet du phénobital et du PCN sur l'induction des UGT 1A6 et 2B1 dans le foie de rats et dans les Liverbeads.</i>	214

<i>Figure VII-3. Effet du phénobabital (PB) sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats..</i>	219
<i>Figure VII-4. Effet du PCN sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats.....</i>	220
<i>Figure VII-5. Données de littérature concernant l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1, par le phénobarbital et le PCN chez le rat.....</i>	220
<i>Figure VII-6. Effet du céfuroxime, de l'atrazine, et de l'iprodione, sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats..</i>	221
<i>Figure VII-7. . Effet du MMI, du PTU, et du perchlorate sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats.....</i>	222

Liste des tableaux

<i>Table II-1. Glandes et hormones qui composent le système endocrinien.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau II-2. Localisation et rôle des récepteurs PPAR.</i>	<i>46</i>
<i>Table II-3. Principaux xénobiotiques actifs sur les récepteurs PPAR.</i>	<i>48</i>
<i>Table V-1. Mechanism of action and effects of thyroid toxicants on thyroid regulation and main toxicity documented regarding substances not being thyroid toxicants</i>	<i>104</i>
<i>Table V-2. Taqman Gene Expression Assays & biomarker families.....</i>	<i>106</i>
<i>Table V-3. Effect of treatment on relative body and organ.....</i>	<i>112</i>
<i>Table VI-1 Mechanism of action and effects of Toxicant on thyroid regulation and main toxicity documented regarding substances not being thyroid toxicant.....</i>	<i>161</i>
<i>Table VI-2. Taqman Gene Expression Assays & biomarker families.....</i>	<i>162</i>
<i>Table VII-1. : Revue de littérature sur l'induction des UGT hépatiques chez le rat par le phénobarbital.</i>	<i>216</i>
<i>Table VIII-1 Liste des modèles cellulaires envisagés pour le criblage de la toxicité directe sur laa thyroïde.....</i>	<i>234</i>
<i>Table VIII-2. Liste des modèles cellulaires envisagés pour le criblage de l'induction des UGT hépatiques</i>	<i>236</i>
<i>Table VIII-3. Proposition d'une batterie de tests à réaliser pour le criblage de la perturbation de l'axe HPT</i>	<i>239</i>

I. Contexte et objectifs du projet de thèse

Les tests de criblage précoce sont essentiels pour identifier au plus vite le potentiel toxique de molécules chimiques candidates au développement, dans le cadre de l'innovation industrielle. Les résultats obtenus sont utilisés comme des signaux d'alerte quant à la possible mise en place de mécanismes de toxicité, lesquels sont ensuite confirmée grâce à des investigations mécanistiques complémentaires. Ces tests doivent être conduits le plus tôt possible au cours du développement, afin de limiter les dépenses engagées pour des molécules chimiques au profil toxicologique incompatible avec l'utilisation envisagée. Les tests de criblage précoce doivent donc être de courte durée, peu onéreux, et d'une complexité limitée afin de permettre leur mise en œuvre en routine. Les tests *in vitro* sont donc envisagés en première intention pour ces raisons et dans le but de limiter le recours à l'utilisation de l'expérimentation animale.

Parmi les nombreux mécanismes de toxicité qui doivent être criblés au cours du développement des produits chimiques et des biocides, la perturbation endocrinienne, est considérée avec un intérêt croissant. La problématique relative aux expositions environnementales à des substances chimiques susceptibles de perturber le système endocrinien se pose comme un enjeu majeur de notre société, depuis le début des années 1990. Ces substances, d'origine naturelle et synthétique, sont appelées « perturbateurs endocriniens » (PE) depuis l'apparition du terme en 1991. Ce terme a été popularisé par Theo Colborn en 1993 auprès de la communauté scientifique d'abord, puis auprès du grand public, en 1996, suite à la publication de son ouvrage « Our Stolen Future, are we threatening our fertility, intelligence and survival? – A scientific Detective Story », dont la préface avait été rédigée par le vice-président des Etats-Unis Al Gore, qui a fortement marqué les esprits.

Le fait que des substances exogènes puissent interagir avec des processus biologiques, soumis à une régulation hormonale, était connu bien avant que ce type de propriétés pharmacologiques puisse être associé à la pollution environnementale. Dès les

années 1940, l'industrie du bétail a su utiliser des composés pharmaceutiques destinés à réguler les cycles de reproduction et à optimiser la prise de poids. Des substances chimiques telles que l'éthinylestradiol, le mestranol, ou le noréthynodrel étaient développées comme agents contraceptifs ou dans un but thérapeutique. En parallèle, la toxicologie a permis d'accéder à la connaissance des effets indésirables de ces composés hormono-mimétiques. Plus tard, le diethylstilbestrol (DES) sera d'ailleurs le premier PE dont l'activité sur l'homme a été avérée. Le DES est un œstrogène de synthèse prescrit à partir de 1958 et pendant plus de trente ans aux femmes enceintes pour prévenir les avortements spontanés, les risques de prématurité et les hémorragies gravidiques. Au début des années 1970, la relation a été établie entre le DES et une série d'anomalies du tractus génital (Newbold, 2004), ce qui a alors été considéré comme un effet indésirable isolé. Ce n'est que plus tard que le lien a été fait entre l'exposition des organismes en milieu naturel à cette substance et sa toxicité en termes de perturbation endocrinienne.

En 1962, suite à la parution du livre "Silent Spring" de Rachel Carson, la relation entre pollution environnementale et toxicité, associée à la perturbation du système hormonal, est devenu un enjeu de société. Dans cet ouvrage, le dichlorodiphenyltrichloroéthane (DDT), pesticide largement utilisé, a été rendu responsable du déclin de populations d'oiseaux, dont la reproduction avait été altérée. Ce livre a permis de mettre en exergue la menace que pouvaient représenter certaines catégories de produits chimiques, pour la pérennité des espèces. Depuis, de nombreux rapports ont décrit des comportements et des développements anormaux du tractus génital chez les poissons et les reptiles exposés à des polluants chimiques pouvant perturber le système endocrinien (Bergman et al., 2012).

Ainsi, nous vivons constamment exposés à une multitude de composés chimiques, dont certains peuvent interférer avec le système endocrinien des espèces sauvages, mais aussi celui des êtres humains. Les PE identifiés sont très divers, et peuvent compter parmi les pesticides, les retardateurs de flamme, les additifs des plastiques, les produits cosmétiques, ce qui multiplie le risque d'y être confronté. Une meilleure connaissance des PE représente un défi scientifique puisque leurs effets dépendent à la fois de l'intensité, de la durée et de la fenêtre d'exposition, ce dernier paramètre étant particulièrement critique durant le développement.

Il est force de constater que les moyens d'identifier les PE font également défaut, en particulier en ce qui concerne leurs nombreux modes d'action toxiques. Si des outils existent pour identifier les mécanismes mis en jeu par les PE connus, les tests qui visent à dépister le caractère PE de substances inconnues sont encore peu nombreux et ne couvrent pas tout le spectre des mécanismes connus. Ce constat, qui semble aujourd'hui faire consensus dans le milieu technico-réglementaire (Bergman et al., 2012; OECD, 2014), amène à l'hypothèse que certains perturbateurs endocriniens ne sont pas dépistés en tant que tels, et ainsi que le risque sanitaire représenté par les PE est sous-estimé.

Si l'accent a initialement été mis sur la perturbation des hormones sexuelles, le besoin se fait aujourd'hui ressentir de mieux identifier et caractériser les PE responsables de la perturbation de la signalisation de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (HPT, pour hypothalamus-pituitary-thyroid). La perturbation des hormones thyroïdiennes est complexe et ne peut se résumer à la mise en œuvre d'un unique événement moléculaire initiateur. L'axe HPT peut être dérégulé à plusieurs niveaux, à commencer par la synthèse des hormones thyroïdiennes, elle-même pouvant être perturbée par différents mécanismes tels l'inhibition de la thyroperoxydase (TPO) ou du symport iodure-sodium (NIS). La régulation en amont de la synthèse hormonale peut également être concernée, au niveau de la sécrétion et de l'action des hormones hypothalamiques et hypophysaires, l'hormone de libération de la TSH (TRH) et la thyrotropine (TSH). Le transport sanguin des hormones thyroïdiennes, l'activité de régulation transcriptionnelle de leurs récepteurs, ou leur activation et inactivation périphérique par les déiodinases, sont également des cibles potentielles dont l'atteinte peut se traduire par une perturbation de l'axe HPT (Boas et al., 2006; Crofton, 2008, Capen, 1994). Les inducteurs des enzymes hépatiques peuvent également être responsables chez le rongeur d'une diminution des hormones thyroïdiennes circulantes en raison de l'augmentation de l'élimination biliaire secondaire à l'augmentation du pool d'UGT hépatiques. (Hood et al., 1999).

Un récent rapport de l'OCDE recense les moyens *in vivo* ou *ex vivo* pour réaliser le criblage des composés susceptibles de mettre en jeu l'un de ces mécanismes *in vitro* ou *ex vivo* (OECD, 2014). Ce rapport montre que des tests existent pour cribler *in vitro* l'action des produits chimiques sur la synthèse hormonale *via* une interaction avec la TPO ou le NIS, leurs

interactions avec les différents récepteurs, transporteurs, ou enzymes périphériques de conversion de l'axe HPT. Néanmoins, la conclusion de cette revue souligne l'impossibilité à l'heure actuelle de réaliser une batterie de tests qui permette de cribler tous les mécanismes de perturbation de l'axe HPT décrits. Il ressort également, de ce travail d'inventaire, qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de test réalisable en routine intégrant le criblage de l'ensemble de ces mécanismes de toxicité.

En ce qui concerne les tests *in vivo*, les tests disponibles et réalisables à courts termes utilisent la métamorphose des amphibiens qui est dépendante des hormones thyroïdiennes (OECD, 2012a). Ces tests ont pour principale caractéristique le fait d'intégrer potentiellement tous les mécanismes possibles de perturbation de la fonction thyroïdienne puisque le paramètre étudié, la métamorphose, est un effet apical des hormones thyroïdiennes. Cette approche est intéressante du fait de la grande conservation de l'axe HPT entre les espèces. Cependant, à côté de cet aspect théorique, les données obtenues à partir d'expériences réalisées chez les amphibiens extrapolables aux mammifères sont peu nombreuses et pas toujours suffisamment claires pour conclure à la pertinence d'utiliser ces tests en routine en toxicologie. En outre, les données actuelles ne montrent pas que les tests sur amphibiens puissent apporter un complément d'information aux tests sur mammifères, actuellement réalisés en routine au cours du développement des produits chimiques (Pickford, 2010). En effet, des paramètres relatifs au criblage des perturbateurs de la fonction thyroïdienne ont été incorporés lors de la réalisation des tests initialement prévus pour le criblage des perturbateurs des hormones sexuelles, tel le test de toxicité orale à dose répétée sur 28 jours (OECD TG 407) ou les essais pubertaires sur mâles et femelles (OECD, 2006a; Zoeller and Tan, 2007). Un test de criblage de la perturbation endocrinienne, y compris thyroïdienne, est également utilisé depuis de nombreuses années. Ce test, appelé IAMRSA (Intact Adult Male Rat Screening Assay) souffre, comme les trois autres tests *in vivo* de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, de difficultés à identifier les composés dont la toxicité est liée directement à une perturbation de la fonction thyroïdienne. En effet, la perturbation de la fonction thyroïdienne n'est pas synonyme de simple modification de concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes. Certaines toxicités peuvent causer une perte d'homéostasie des hormones thyroïdiennes transitoire,

sans autre conséquence sur le reste de la signalisation de l'axe HPT, du fait de processus adaptatifs, telles que la modulation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes ou celle de la conversion périphérique de T₄ et T₃ (Becker et al., 2012).

Le travail présenté dans cette thèse se place dans ce contexte et tente, à son échelle, de participer à combler ce manque à la fois de connaissance des PE et des moyens de détection pour les dépister.

Ainsi, la présente thèse se propose de décrire :

- Un test *in vivo* sur rat mâle adulte, susceptible de détecter les molécules potentiellement perturbatrices de la fonction thyroïdienne, après seulement sept jours d'exposition des animaux.
- Un modèle *in vitro* de lignée de thyrocytes de rat, PCCl3, susceptible de détecter les molécules qui perturbent la synthèse des hormones thyroïdiennes.
- La potentielle complémentarité des deux tests *in vitro*, l'un utilisant la lignée de thyrocyte de rat mentionnée ci-dessus et l'autre utilisant des hépatocytes primaires cryopréservés (Liverbeads), qui permettrait de détecter les perturbations de la fonction thyroïdienne *via* les différents mécanismes impliquant la glande thyroïde et/ou le foie.

Si l'essai à courts termes *in vivo* et/ou la combinaison de modèles *in vitro* envisagés, impliquant la thyroïde et/ou le foie, répondent aux attentes énoncées ci-dessus, nous serions en mesure de proposer une nouvelle façon de dépister plus précocement la mise en œuvre de tous les mécanismes connus de perturbation de la fonction thyroïdienne.

Cette nouvelle approche permettrait de réduire significativement le nombre d'animaux sacrifiés, ainsi que les ressources humaines et financières engagées pour identifier les perturbateurs de la fonction thyroïdienne, conformément à ce qui est recommandé au niveau européen d'un point de vue réglementaire.

Dans le cadre de ce projet de thèse, des rats mâles adultes ont été exposés à chacune des huit molécules connues pour interférer avec la synthèse des hormones thyroïdiennes (Propylthiouracyle, Methimazole, Amitrole, Iode en excès, Iofensulfone, Amiodarone, Lithium, et Perchlorate de sodium) ainsi qu'à chacune des deux molécules perturbatrices endocriniennes au profil toxicologique largement décrit mais sans effet connu sur la fonction thyroïdienne telles que l'Iprodione et Atrazine.

La lignée de thyrocyte de rat PC-Cl3 a été exposée à une des quatre molécules connues pour agir sur la synthèse des hormones thyroïdiennes (THs), telles que le Propylthiouracyle, le Méthimazole, l'Iode en excès, et le Perchlorate de sodium, ainsi qu'à une des trois molécules au profil toxicologique largement décrit mais sans effet connu sur la fonction thyroïdienne, telles que l'Iprodione, l'Atrazine, et le Cefuroxime.

Le modèle d'hépatocytes primaires cryopréservés a quant-à-lui pu être exposé à des substances connues pour provoquer la diminution des taux de TH circulantes chez le rat par différents mécanismes, et à des substances sans effet connu sur l'axe HPT. Le phénobarbital et le pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) entraînent cette réduction des THs circulantes suite à l'induction transcriptionnelle de gènes codant pour des enzymes hépatiques de phase II (UGT). Le PTU, le MMI, et le perchlorate perturbent la synthèse hormonale, et l'atrazine, l'iprodione, et le céfuroxime n'ont pas d'effet connu sur l'axe HPT.

II. Les grands axes de la régulation hormonale

A. Les perturbateurs endocriniens et la thyroïde

La prise en compte par les autorités sanitaires du danger, pour l'homme et les animaux, de l'exposition à des molécules perturbatrices du système endocrinien est relativement récente. En effet, ce n'est qu'à partir du milieu des années 1990 que les publications relatives à ce sujet ont réellement été nombreuses et médiatisées. Parallèlement, la prévalence de certaines maladies connues pour - ou suspectées d' - être liées à des facteurs environnementaux, en lien avec le système endocrinien, n'a cessé d'augmenter. C'est notamment le cas de l'obésité, de l'hyperlipidémie et du diabète, des maladies cardiovasculaires, du syndrome métabolique, de maladies reproductives telle l'infertilité, de l'autisme, ou encore du trouble de l'attention avec hyperactivité (Bergman et al., 2012). Pour ces maladies en augmentation, une étiologie possible est l'exposition à des perturbateurs endocriniens (PE) (OECD, 2012a). En effet, l'étude des maladies citées ci-dessus montre des liens statistiques et des étiologies possibles reliant leur apparition à l'exposition aux PE.

Ainsi, l'exposition néonatale aux PE œstrogène-mimétiques ou anti-androgéniques est une hypothèse qui peut être envisagée pour expliquer l'augmentation d'incidence du syndrome de dysgénésie testiculaire, caractérisée par une diminution de la qualité des semences masculines, des malformations du pénis (hypospadias), des testicules non descendues, voire de l'apparition d'un cancer des testicules. Cette hypothèse est cohérente avec certaines études qui ont démontré que le syndrome de dysgénésie testiculaire pouvait être induit chez le rongeur après une exposition néonatale à des composés anti-androgéniques (Skakkebaek et al., 2001; Sonne et al., 2004).

Par ailleurs, certaines substances sont aujourd'hui reconnues comme étant « obésogènes », c'est-à-dire que certaines d'entre elles altèrent l'homéostasie des lipides, ou promeuvent l'adipogenèse ou l'accumulation des lipides (Grün, 2010). Par exemple, un

polluant tel que le tributylétain (TBT), largement répandu dans l'environnement, est capable de lier et d'activer le complexe PPAR γ -RXR *in vitro* (Kanayama et al., 2005) et d'induire l'augmentation de la masse de tissus adipeux *in vivo* chez la souris (Grün et al., 2006). Le complexe PPAR γ -RXR étant connu pour être un régulateur positif de la différenciation des adipocytes et de la biosynthèse lipidique (Rosen et al., 1999), il est fort probable que le TBT soit un polluant environnemental perturbateur de l'axe de signalisation dépendante de PPAR. En outre, comme le montre la récente revue de Chevalier et Fénichel (Chevalier and Fénichel, 2015), des données expérimentales obtenues à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des données épidémiologiques sont en faveur de l'existence d'une corrélation entre l'exposition à certains PE et l'apparition du diabète insulino-indépendant, par diminution de la sensibilité à l'insuline ou diminution de la fonction des cellules β pancréatiques, de l'obésité, et du syndrome métabolique.

Le cas des maladies causées par une perturbation du neuro-développement est moins clair. Si de nombreuses relations ont pu être établies entre l'exposition à certains produits chimiques durant le développement et des déficiences neurologiques, en revanche l'épidémiologie et les recherches étiologiques ne parviennent pas à relier clairement l'autisme ou le syndrome de déficit de l'attention avec hyperactivité à l'exposition à des PE (Bellinger, 2013; Colborn, 2004; OECD, 2012a). L'importance du maintien de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes (THs) étant reconnu comme primordial pour le développement des voies nerveuses, sa perturbation en réponse à l'exposition à des contaminants environnementaux pourrait facilement expliquer l'augmentation d'incidence de ces désordres neurologiques. Ce type de corrélation a en revanche pu être établi expérimentalement chez le rat. L'exposition des individus pré- et postnataux au polybromodiphenylether-47 (PBDE-47) a permis d'induire une diminution de la T₄ circulante et un syndrome d'hyperactivité (Suvorov et al., 2009). Notons que le PBDE-47 est connu pour perturber les niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes chez l'agneau (Abdelouahab et al., 2009), d'autres PBDE induisent le même type de perturbation chez le jeune rat (Zhou et al., 2001). L'hypothèse chez l'homme qu'une exposition péri-natale aux PE pourrait être responsable de l'apparition d'autisme ou du syndrome de déficit de l'attention est attentivement prise en considération, même si non démontrée à ce jour.

Ces exemples illustrent bien la problématique de santé publique relative aux PE. Leur médiatisation s'est faite parallèlement à la mise en évidence de l'augmentation d'incidence de pathologies, dont les étiologies mal connues peuvent être liées aux PE. Ainsi, la notion même de PE reste mal définie. Un important travail de la part de la Commission Européenne est en cours depuis plusieurs années pour donner une définition officielle au terme « perturbateur endocrinien », laquelle est attendue pour une application uniforme de la réglementation REACH, et de celles régissant la commercialisation des biocides et des produits de protections des plantes (European Commission, 2015). Néanmoins, la communauté scientifique utilise largement le terme de perturbateur endocrinien, en se focalisant soit sur les événements moléculaires qui initient une perte, durable ou transitoire, de l'homéostasie d'une ou plusieurs hormones, soit sur l'existence de conséquences délétères de celle-ci.

Le système endocrinien est constitué de glandes endocrines qui secrètent des hormones dans la circulation sanguine ou lymphatique dans le but de réguler de nombreux processus biologiques. Différentes voies de signalisation, ou axes, composent le système endocrinien. Ces axes, composés d'organes et d'hormones aux fonctions diverses, ont des actions interdépendantes. Ces actions permettent d'assurer la survenue d'événements essentiels au développement des organismes, tout comme au maintien de l'homéostasie dans les organismes adultes. De nombreuses études ont montré que la bonne régulation de ces axes peut être perturbée à différents niveaux par des xénobiotiques, appelés alors perturbateurs endocriniens (PE). De par la multitude de cibles et de modes d'action concernés, les PE ne sont pas faciles à définir. Si la liaison de petites molécules lipophiles aux récepteurs nucléaires des hormones semble être un mécanisme majeur conduisant à une activation (effet agoniste) ou une inactivation (effet antagoniste) inappropriée, certains PE agissent *via* une modification des taux d'hormones circulantes. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a choisi de définir les PE comme des « substances exogènes ou mélanges qui altèrent une ou plusieurs fonction(s) du système endocrinien, et qui en conséquence causent des effets néfastes sur la santé d'organismes intacts, sur celle de leur progéniture, ou sur celle de leur (sous)population (Bergman et al., 2012).

Cette définition établie, il convient de s'interroger plus précisément sur son champ d'application. Le système endocrinien rapidement décrit ci-dessus implique ainsi un nombre considérable d'organes et d'hormones. Les glandes endocrines spécialisées, classiquement intégrées au concept de système endocrinien, sont l'hypothalamus, l'hypophyse, les gonades, la thyroïde, les glandes parathyroïde, les glandes surrénales, et le pancréas. En complément de cette activité endocrine spécialisée, certains autres organes secrètent des hormones de façon secondaire mais néanmoins essentielle, tels que le cœur, le tissu adipeux, le foie, les reins, les intestins, et les muscles. Ces organes et les hormones qu'ils secrètent sont représentés de façon schématique dans la figure II-1. Les hormones sont des molécules secrétées dans le milieu extra-cellulaire. Elles ont une action sur l'activité sécrétrice d'autres glandes, sur le métabolisme d'autres cellules, ou sur la contraction des cellules musculaires lisses. Leur nature biochimique peut être de trois types différents (Wilson, 2009) :

- **Les hormones stéroïdiennes** sont de nature lipidique et dérivent du cholestérol. Elles sont donc hydrophobes et traversent ainsi aisément les membranes cellulaires, mais leur circulation dans le sang nécessite la formation de complexes avec des protéines plasmatiques. Sous forme libre, ces hormones pénètrent dans les cellules cibles pour se lier à des récepteurs nucléaires. Les hormones sécrétées par les corticosurrénales, les gonades et le placenta sont des hormones stéroïdiennes.

Table II-1. Glandes et hormones qui composent le système endocrinien. D'après (Cornelia Schmutzler et al., 2007)

Systèmes	Glandes	Hormones	Abbréviations	Natures	Rôles
Axe hypothalamo-hypophysaire	Hypothalamus	Hormone thyroïdienne	TRH ou PRH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion de TSH et PRL par l'hypophyse
		Hormone de libération de l'hormone de croissance	GHRH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion de GH par l'hypophyse
		Gonadolibérine	GnRH ou LHRH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion de FSH et LH par l'hypophyse
		Corticolibérine	CRH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse
	Anté-hypophyse	Dopamine	DA	Monoaminée	Inhibition de la sécrétion de PRL par l'hypophyse
		Hormone de croissance	GH	Peptidique	Stimulation de la croissance et la reproduction cellulaire
		Prolactine	PRL	Peptidique	Stimulation de la lactation
		Hormone folliculo-stimulante	FSH	Peptidique	Femelle : Stimulation de la maturation des follicules ; mâle : régule la spermatogenèse
		Hormone lutéinisante	LH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion d'œstrogènes et induit l'ovulation chez la femelle. Stimule la sécrétion de testostérone chez le mâle.
		Thyréostimuline	TSH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion d'hormones thyroïdiennes
		Hormone Adrénocorticotrope	ACTH	Peptidique	Stimulation de la sécrétion des glucocorticoïdes
		Mélano-stimuline	MSH	Peptidique	Stimulation de la production de mélanine
	Post-Hypophyse	Ocytocine		Peptidique	Stimulation de la contraction utérine et la lactation
		Vasopressine	ADH	Peptidique	Inhibition de la sécrétion d'urine et maintient l'équilibre électrolytique
Surrénales	Cortex	Cortisol		Stéroïde	Régulation de la croissance, du métabolisme et de la maturation des tissus
		Déhydro-épiandrostérone	DHEA	Stéroïde	Croissance des phanères, maturation cérébrale
	Medulla	Adrénaline		Monoaminée	Stimulation du métabolisme, régulation de la tension artérielle et de l'activité cardiaque en réponse à un stress ou une activité physique
		Noradrénaline	NAD	Monoaminée	Régulation de la vigilance, les émotions, l'apprentissage.
Thyroïdes	Thyroïde	Triiodothyronine	T3	Monoaminée	Régulation de mécanismes physiologiques dont le neurodéveloppement, le métabolisme, et les processus de croissance
		Thyroxine	T4	Monoaminée	
		Calcitonine		Peptidique	Régulation du métabolisme du phosphore et du calcium
	Parathyroïdes	Parathormone	PTH	Peptidique	Régulation du métabolisme du phosphore et du calcium
Gonades	Testicules	Testostérone	T	Stéroïde	Acquisition de caractères sexuels masculins et la reproduction
		Hormone Antimüllérienne	AMH	Stéroïde	Régression des canaux de Müller durant l'embryogenèse
		Inhibine		Peptidique	Inhibition de la synthèse de FSH par l'hypophyse
	Ovaires	Œstrogènes	E1, E2, E3	Stéroïde	Acquisition de caractères sexuels féminins, régule le cycle ovarien
		Progestérone	P4	Stéroïde	Préparation de l'endomètre à la nidation, Maintien du col de l'utérus fermé, stimuleStimulation du développement des glandes mammaires
		Androstènedione		Stéroïde	Régule la synthèse des œstrogènes
		Inhibine		Peptidique	Inhibition de la synthèse de FSH par l'hypophyse
		Glucagon		Peptidique	Régulation de la glycémie
Autres glandes endocrines	Pancréas	Insuline		Peptidique	Régulation de la glycémie
		Somatostatine		Peptidique	Inhibition de la sécrétion de GH, TSH, insuline et glucagon
	Placenta	Hormone chorionique gonadotrope	hCG	Peptidique	Maintien du corps jaune durant la grossesse et de sa sécrétion de progestérone
		Estradiol	E2	Stéroïde	Principale source d'œstrogènes durant la grossesse
		Progestérone	P4	Stéroïde	Maintien de la grossesse
	Epiphyse	Mélatonine		Monoaminée	Régulation de la reproduction, le système immunitaire
	THymus	Thymuline		Peptidique	Immunocompétence des lymphocytes T
		Thymopoïétine		Peptidique	Immunocompétence des lymphocytes T

- **Les hormones peptidiques**, de dimensions variables allant de quelques acides aminés à près de 200 acides aminés, sont synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique granuleux après transcription de leurs gènes en

ARN messenger (ARNm). Hydrophiles, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire à travers la membrane plasmique est rendue possible par leur inclusion au niveau de l'appareil de Golgi dans des vésicules sécrétoires. Après un transport sanguin qui ne nécessite pas de transporteur, les hormones peptidiques agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs protéiques transmembranaires. Cette classe d'hormones comprend les hormones produites par l'antéhypophyse, les parathyroïdes, le pancréas ainsi que les hormones activatrices de l'hypothalamus.

- **Les hormones mono-aminées** sont des petites molécules qui dérivent d'acides aminés, principalement de la tyrosine et du tryptophane. Comme les hormones peptidiques, l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et la mélatonine circulent librement dans le sang et agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques. A l'inverse, un autre sous-groupe d'hormones mono-aminées dérivées de la tyrosine est constitué par des hormones thyroïdiennes qui ont un mode d'action un peu différent. Les deux principales hormones thyroïdiennes, la T_3 et la T_4 , caractérisées par des atomes d'iode, ont besoin d'être liées à des protéines plasmatiques pour circuler dans le sang. Ces protéines plasmatiques sont l'albumine, la TBG (thyroxine-binding globulin), et la TTR (Transthyretin). Au niveau des cellules cibles, elles agissent sur des récepteurs intracellulaires spécifiques, après transport transmembranaire médié par les transporteurs OATP, MCT8 et MCT10 (Visser, 2000).

Le tableau II-1 présente une vision synthétique des glandes et hormones qui forment le système endocrinien.

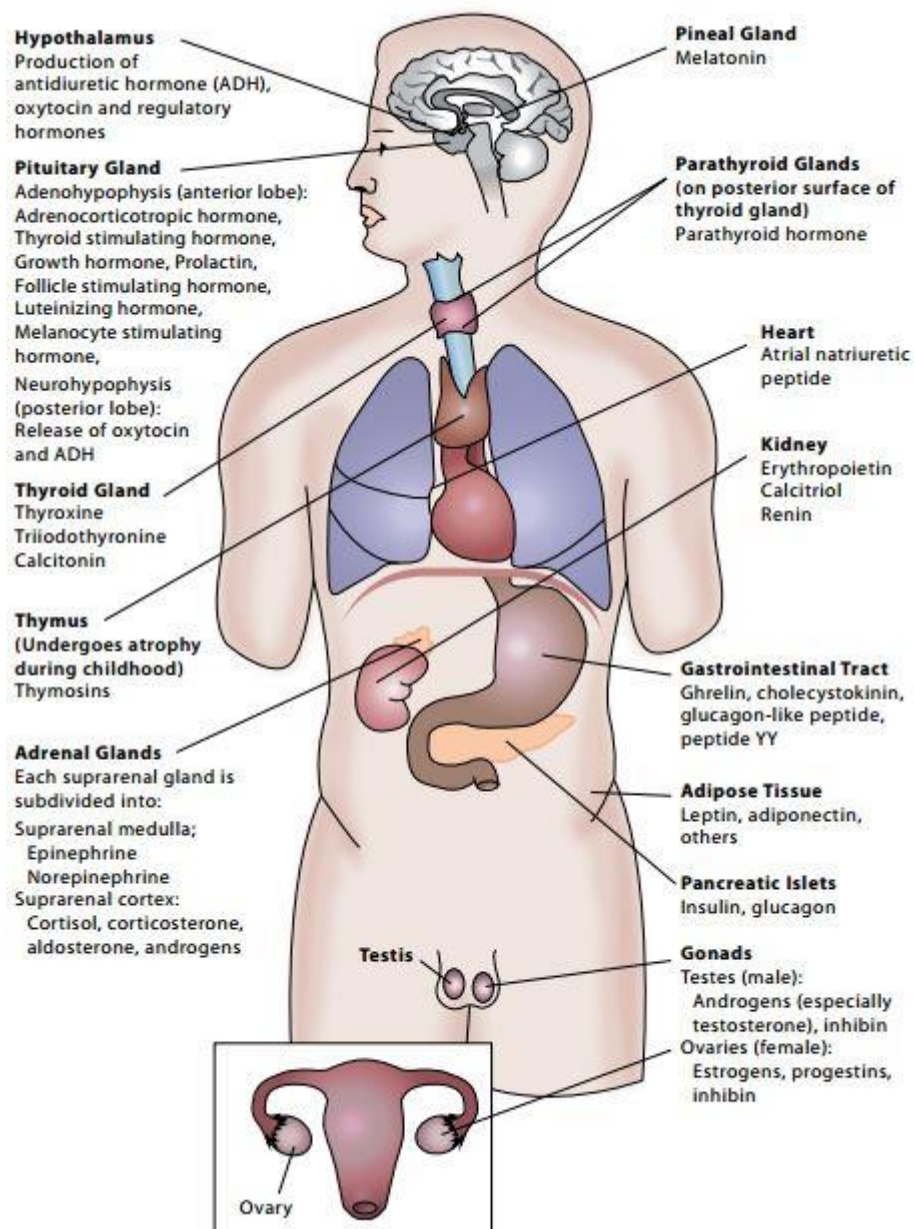


Figure II-1. Les glandes endocrines et leurs produits de sécrétion. D'après Bergman et al, 2012.

Pour mieux cerner l'effet que peuvent avoir les PE chez les mammifères et en particulier chez l'homme, plusieurs axes fonctionnels doivent être distingués au sein du système endocrinien. Tous ces axes seront décrits dans les chapitres qui suivent. Toutefois une attention particulière aura été consacrée au chapitre abordant l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde, celui-ci étant au centre du sujet de cette présente thèse. Un chapitre indépendant lui sera consacré.

B. Axe hypothalamus-hypophyse-gonades (HPG)

L'axe HPG, très conservé chez les vertébrés, a une importance toute particulière dans la survie des espèces puisqu'il contrôle la reproduction. Une représentation schématique de l'axe HPG est présentée dans la figure II-2. L'hypothalamus intègre des signaux nerveux en provenance du système nerveux central (SNC) et des signaux hormonaux. Ainsi, au niveau de l'hypothalamus, la résultante des effets de facteurs internes tels que la nutrition, le métabolisme, ou les niveaux hormonaux, et de facteurs externes, tels que la température ou les photopériodes, conditionnent la sécrétion de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) qui module la sécrétion par l'hypophyse antérieure des hormones gonadotrophines telles que l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). A leur tour, les hormones gonadotrophines contrôlent le développement des gonades, en partie *via* l'induction de la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles. Ces dernières sont divisées en trois classes : les œstrogènes (majoritairement l'œstradiol), les androgènes (principalement la testostérone), et les gestagènes (majoritairement la progestérone). L'axe HPG est en grande partie régulé par rétrocontrôle négatif exercé par les différentes hormones qu'il génère. Chez la femelle, la FSH a un rôle majeur dans le recrutement cyclique des ovocytes pendant la phase folliculaire, tandis qu'un pic de LH déclenche l'ovulation et la phase lutéale. Chez le mâle, la LH régule la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig, tandis que la FSH, grâce à son rôle dans le contrôle de l'activité des cellules de Sertoli, participe avec les androgènes à stimuler la spermatogenèse.

1. Les hormones stéroïdiennes sexuelles

Les gonadotrophines (FSH et LH) stimulent la croissance et le développement des gonades *via* la synthèse des stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes, et gestagènes) et des facteurs de croissance. Chez l'homme comme chez le rongeur, la FSH régule la gamétogenèse et la LH induit la stéroïdogenèse. L'activité des stéroïdes sexuels est médiée par des récepteurs nucléaires, qui lorsqu'ils sont activés agissent comme facteurs de transcription au sein du noyau.

L'axe HPG a pour fonction première de permettre et de réguler la production des cellules germinales et de coordonner les fonctions reproductrices avec les conditions

corporelles et environnementales. Durant le développement, l'axe HPG régule également les événements qui concourent à l'acquisition du phénotype mâle ou femelle. Les œstrogènes sont souvent décrits comme des hormones femelles, et les androgènes comme des hormones mâles. Mais chez le mâle, les œstrogènes sont indispensables à la spermatogénèse et à la masculinisation du cerveau. Chez la femelle, outre le fait que comme chez le mâle les œstrogènes dérivent de l'aromatisation de la testostérone, des études ont montré que chez des femelles KO (knock-out) pour les récepteurs aux androgènes, donc dépourvues de ces récepteurs, l'absence de signalisation androgénique aboutissait à l'altération du fonctionnement ovarien ainsi qu'à un mauvais développement mammaire (Walters et al., 2010; Zhou, 2010).

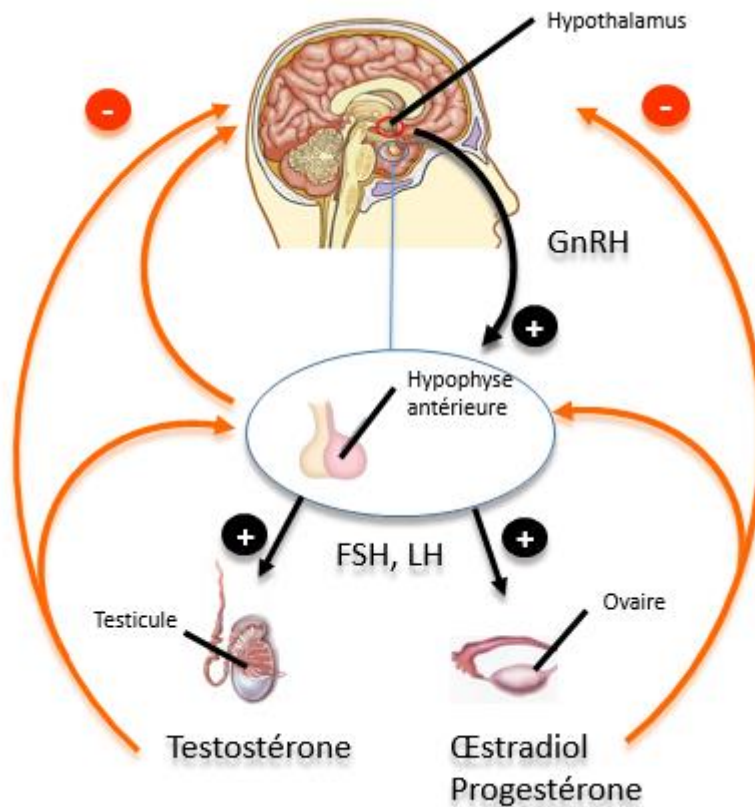


Figure II-2. Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades (HPG). D'après Bergman et al. 2012.

Les gestagènes, qui forment la troisième classe d'hormones stéroïdes, sont également indispensables à la reproduction chez les mammifères. Chez la femelle, la progestérone a un rôle central au niveau de l'utérus et des glandes mammaires à la fois lors

de l'initiation de la grossesse et au cours de celle-ci. Concernant les gamètes mâles, il a été montré que la fixation de la progestérone influe sur les spermatozoïdes *via* la fixation sur ses récepteurs permettant leur capacitation, stimule leur motilité, et permet la réaction acrosomale qui conditionne la fécondation des ovocytes (Aquila and De Amicis, 2014).

En plus de leur activité essentielle pour la reproduction, les hormones stéroïdes sexuelles modulent diverses fonctions physiologiques telles le métabolisme, le système immunitaire, le système cardiovasculaire, ou l'homéostasie du squelette (Bergman et al., 2012).

2. Conséquences de la perturbation des hormones sexuelles

a. Voie de signalisation des œstrogènes.

La perturbation de la voie de signalisation des œstrogènes est particulièrement critique lorsqu'elle se produit chez le mâle exposé à des composés œstrogéno-mimétiques intervenant sur l'appareil reproducteur en développement. Une telle perturbation peut induire un syndrome de dysgénésie testiculaire (Delbès et al., 2006). L'exposition à un composé œstrogéno-mimétique semble également pouvoir nuire à la formation de l'appareil reproducteur femelle, comme l'illustre le cas du diethylstilbestrol (DES). L'exposition *in utero* au DES a été incriminée dans la survenue de malformations de l'appareil reproducteur femelle et mâle (Newbold, 2004). Les perturbateurs endocriniens oestrogéniques sont suspectés d'être responsables de l'augmentation d'incidence de l'obésité et du syndrome métabolique (Newbold et al., 2009). Le bisphénol A (BPA) est suspecté d'induire l'apparition du diabète de type II (Moon et al., 2015). Parmi les PE à effet oestrogénique les plus fréquemment cités, on peut compter le BPA, les PCB (polychlorinated biphenyls), ou les esters de phtalate. Il est notable qu'aucun de ces composés n'est décrit comme toxique uniquement par son activité oestrogénique. Malgré le nombre important d'études sur le sujet, les conséquences sanitaires de l'exposition aux PE polluants environnementaux à effet « oestrogénique » sont toujours inconnues (Mattison et al., 2014). Une autre voie de perturbation de la voie de signalisation des oestrogènes est celle de l'inhibition de l'aromatase, enzyme clef de la synthèse des oestrogènes à partir de la testostérone, mise en

évidence par exemple dans l'étude de O Connor et al. (2002) après exposition de rats au fadrozole.

b. Voie de signalisation des androgènes

Dans ce cas particulier où des androgènes de synthèse sont volontairement administrés pour accroître la masse musculaire, des effets secondaires sur le métabolisme ou la croissance sont fréquemment observés. Certains PE tels que le flutamide, certains esters de phtalates, ou la vinclozoline par exemple ont des propriétés anti-androgéniques bien identifiées chez le rongeur, avec une activité inhibitrice sur les récepteurs aux androgènes (O Connor et al., 2002). D'autres composés telle que le fadrozole peuvent être responsables de l'inhibition de l'aromatase (O Connor et al., 2002). Enfin, des substances telles que le kétoconazole peuvent induire une inhibition générale de la synthèse de la testostérone (Trachtenberg and Zadra, 1988).

c. Voie de signalisation des gestagènes

Les effets secondaires chez la femme de la prise de gestagènes de synthèse, utilisés dans les contraceptifs oraux, sont bien connus et caractérisés. Ils sont essentiellement d'ordre métabolique, et facilitent la survenue de maladies cardiovasculaires. Ils sont également impliqués dans l'augmentation d'incidence du cancer du sein (Hapgood et al., 2004). Certains composés considérés comme polluants environnementaux, dont le pesticide methoxychlore, sont susceptibles de diminuer la concentration de progestérone circulante chez le rat (Uzumcu et al., 2006).

C. Axe hypothalamus-hypophyse-surrénales (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA)

Chez les mammifères, l'axe HPA (figure II-5) a un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme. Il participe également à la régulation de la croissance, de la reproduction, et du système immunitaire. L'axe HPA est sensible à de nombreux stimuli environnementaux, permettant ainsi à l'organisme de résister à différents stress. De nombreuses pathologies, comme le diabète ou l'obésité, sont associées à des perturbations chroniques de l'axe HPA.

L'hypothalamus sécrète la CRH (corticotropin-releasing hormone, ou hormone permettant la libération de la corticotrophine) et la vasopressine (AVP). Ces deux hormones vont agir sur l'hypophyse, qui à son tour va sécréter la corticotrophine (ACTH) qui va stimuler le cortex surrénalien. Cette stimulation conditionne la sécrétion de glucocorticoïdes ; la production d'hormones stéroïdes sexuelles telles la dihydroépiandrostérone (DHEA), la DHEA sulfate (DHEAS), et l'androstènedione (AND); et la synthèse de minéralocorticoïdes. La sécrétion par l'hypothalamus et l'hypophyse est également régulée par voie nerveuse. D'autres facteurs sont également susceptibles d'agir sur l'axe HPA à différents niveaux, comme par exemple les urocortines, le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide), ou bon nombre d'interleukines (IL). La sécrétion de minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, et stéroïdes sexuels résulte donc de l'intégration de nombreux stimuli hormonaux et environnementaux. Le glucocorticoïde le plus important chez l'homme est le cortisol, tandis que les rongeurs et la plupart des vertébrés sécrètent de la corticostérone. Les glucocorticoïdes participent à la régulation de leur propre synthèse et sécrétion, par le rétrocontrôle négatif qu'ils exercent sur l'hypothalamus et l'hypophyse.

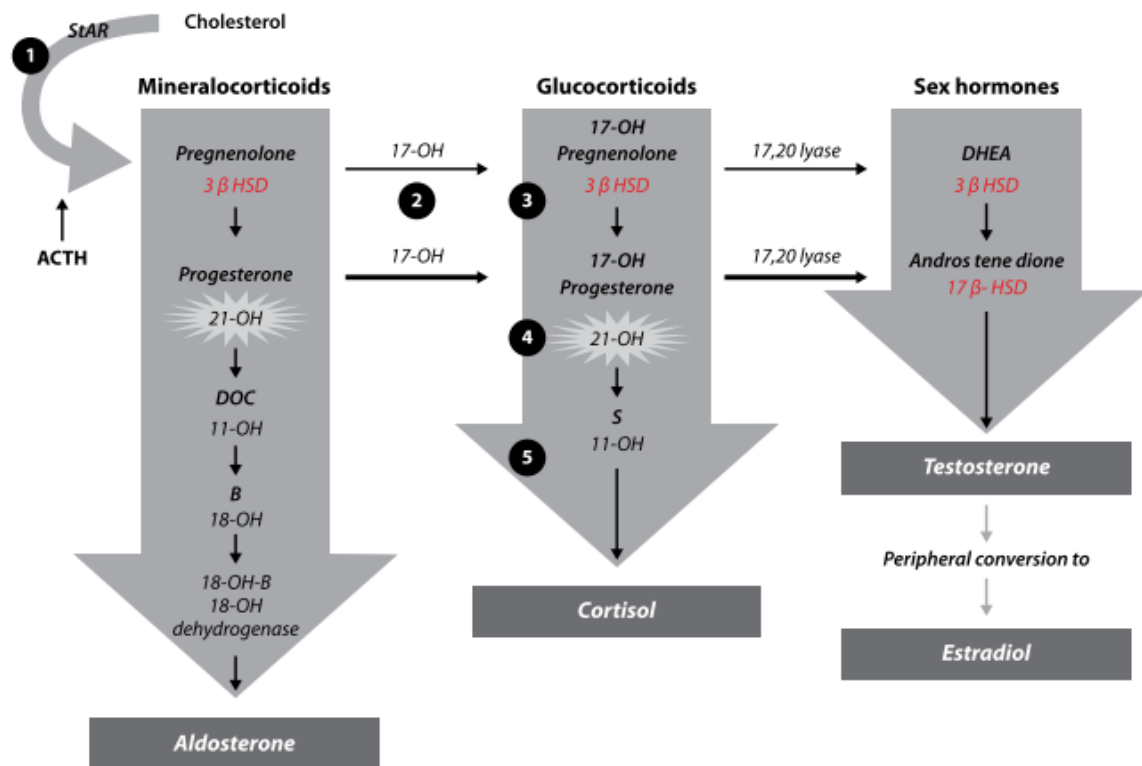


Figure II-3. Stéroïdogénèse surrénalienne. Le cholestérol pénètre la mitochondrie grâce à la protéine de transport *StAR*. D'après (Bergman et al., 2012).

La stéroïdogénèse est schématisée dans la figure II-4. Chez l'homme, le cortisol et l'aldostérone sont les deux hormones surrénaliennes les plus importantes physiologiquement, alors que la DHEA est la plus abondante.

1. Les glucocorticoïdes

Cortisol et corticostérone ont pour rôle essentiel la dégradation des protéines et du tissu adipeux pour leur utilisation dans la gluconéogénèse. Ils permettent ainsi le maintien de la glycémie à un niveau normal. Les glucocorticoïdes sont aussi impliqués dans la régulation de la volémie et de la pression sanguine. Ils ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Durant le développement, et en particulier durant l'embryogenèse, les glucocorticoïdes influencent le développement des cellules de la crête neurale.

2. Les minéralocorticoïdes

L'aldostérone régule la balance électrolytique de l'eau en réduisant l'excrétion de sodium, essentiellement en favorisant sa réabsorption par le rein. Une hyper-sécrétion d'aldostérone est source d'hypertension et d'œdèmes dus à l'excès de sodium qui en résulte, et à la rétention d'eau qui lui est associée. Des dysfonctionnements neuromusculaires, causés par les pertes de potassium concomitantes, sont alors observés.

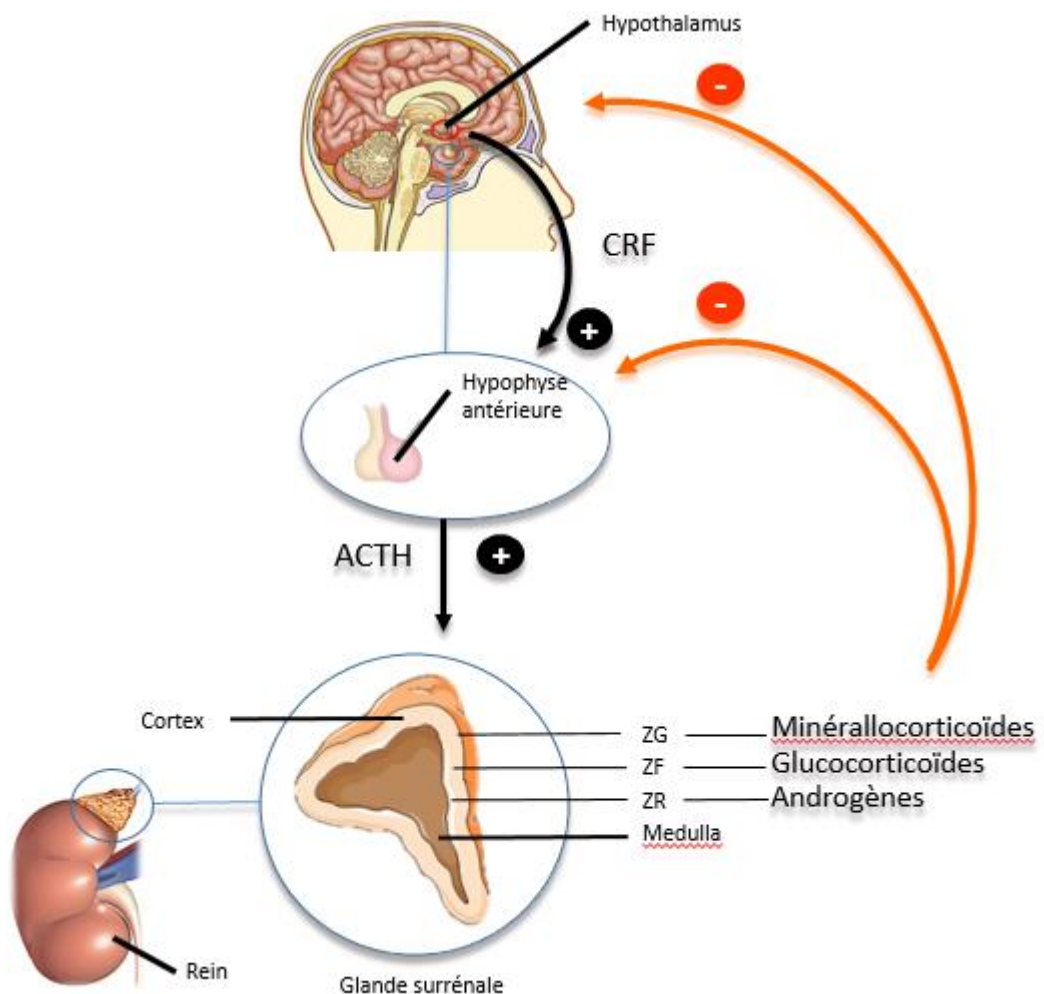


Figure II-4. Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien (HPA). D'après Bergman et al. 2012.

3. Les hormones stéroïdes sexuelles surrénaliennes

La DHEA est essentielle dans les débuts de la grossesse jusqu'à la production d'œstrogènes par le placenta. Son rôle après la naissance est moins clair. Les stéroïdes

sexuels commencent à être sécrétés vers l'âge de 3 ans, pour décroître graduellement après l'âge de 30 ans. On parle d'adrénarchie, et d'adrénopause respectivement. Ces stéroïdes pourraient être à l'origine de la pousse des poils pubiens et axillaires en période pré-pubertaire, et avoir un rôle dans le déclenchement de la puberté.

4. La perturbation de l'axe HPA

L'axe HPA a des liens étroits avec le système immunitaire, la fonction thyroïdienne, le métabolisme, la croissance, le développement et la reproduction. Ainsi, tout dérèglement d'un de ces systèmes est susceptible de perturber l'axe HPA. Cela explique peut-être en partie pourquoi malgré la présence dans l'environnement de nombreux PE susceptibles d'avoir une action sur l'axe HPA et d'un nombre conséquent d'études, il n'existe que peu d'exemples concernant l'impact environnemental sur l'axe HPA chez le mammifère.

a. Fixation agoniste ou antagoniste aux récepteurs des stéroïdes

L'usage de glucocorticoïdes en médecine humaine est très courant, ce qui explique que l'eau en milieu naturel puisse contenir des concentrations importantes de glucocorticoïdes naturels (cortisone) et synthétiques (dexaméthasone, prednisone, et prednisolone pour les plus courants) (Chang et al., 2007; Van der Linden et al., 2008). Des antagonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes, comme le RU 486 (mifepristone), sont également utilisés en clinique et sont des polluants environnementaux PE.

b. Synthèse des stéroïdes

La réglisse est traditionnellement utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'acide glycyrrhétinique, son principal principe actif, augmente *in vitro* la libération de DHEA et de déoxycorticostérone libre dans les cellules humaines H295R (Al-Dujaili et al., 2011). L'acide glycyrrhétinique, certains phtalates, et des composés organostanniques (par exemple le tributylétain, TBT) inhibent *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur la 11 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type 2 (11 β -HSD2), enzyme responsable chez l'homme de la conversion du cortisol en cortisone (Ma et al., 2011). Le cadmium est responsable chez la femelle rat gestante, selon un mode d'action encore à préciser, de perturbations de la concentration placentaire de corticostérone, avec des conséquences en termes d'apparition de pré-

éclampsie ou de diminution du poids à la naissance des nouveau-nés (Ronco et al., 2009; Wang et al., 2014).

c. Fixation agoniste ou antagoniste aux récepteurs de la vasopressine

Les médicaments analogues de la vasopressine utilisés en traitement des troubles électrolytiques, de la tension, ou de la miction (e.g. desmopressine, terlipressine), ou ceux antagonistes de la vasopressine (e.g. les « vaptans ») utilisés dans le traitement de l'hyponatrémie ou du syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone anti-diurétique (SIADH) sont des PE potentiels lorsque l'exposition est environnementale. Les composés organiques halogénés (PCB et PBDE) ont un potentiel de perturbation de la fonction de la vasopressine chez les mammifères, sans que leur activité sur les récepteurs à la vasopressine ne soit démontrée (Kodavanti and Curras-Collazo, 2010).

d. Composés neuroactifs

Il existe des doutes quant à l'action de certains médicaments psychotropes, notamment des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine, sur l'axe HPA. Ainsi chez le rat, la fluoxétine, semble réduire la concentration de corticostérone chez le rat (Elaković et al., 2010), alors que cette dernière reste inchangée après administration de fluxilan (Dronjak et al., 2007). En outre, toujours chez le rat, l'administration de fluoxétine empêche les événements dépendants de la corticotrophine (Lowry et al., 2009).

e. Agonistes des récepteurs à la CRH

Des analogues de synthèse de la CRH (DMP696 et DMP904) sont utilisés en thérapeutique comme antidépresseurs.

f. Agonistes du récepteur AhR (Arylhydrocarbon Receptor)

Les composés organiques halogénés (PCB et PBDE) et la β -naphtoflavone, connus pour être agonistes du récepteur AhR, perturbent chez les mammifères de nombreuses réponses dépendantes du cortisol ou de l'AVP (Bergman et al., 2012; OECD, 2012b).

g. Androgènes et Œstrogènes

Les composés aux propriétés œstrogéniques ou androgéniques sont également perturbateurs de l'axe HPA par leur influence directe sur la sécrétion d'AVP et CRH par l'hypothalamus (Bergman et al., 2012; OECD, 2012b).

D. Voie de signalisation des acides rétinoïques

Le rétinol, ou vitamine A, est une vitamine liposoluble dont l'origine est alimentaire. Chez les vertébrés, les rétinoïdes interviennent dans la régulation de divers processus de différenciation au cours du développement. Leur action est conditionnée par leur association aux récepteurs RAR (Retinoic acid Receptor) et RXR (Retinoid X Receptor).

1. Voie de signalisation du récepteur RAR

Les récepteurs RAR forment un facteur de transcription par hétérodimérisation avec le récepteur RXR. L'exposition pré-, péri-, ou post-natale à des rétinoïdes exogènes entraîne des anomalies du plexus brachial et du tube neural chez les vertébrés (OECD, 2012a).

2. Voie de signalisation du récepteur RXR

Le récepteur RXR, très conservé au cours de l'évolution, a un rôle majeur dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques tels que le développement, la reproduction, l'homéostasie lipidique, ou le métabolisme. Le récepteur RXR peut former un homodimère activé par l'acide 9-cis rétinoïque et l'acide docohexanoïque. Il peut également former un hétérodimère avec de nombreux récepteurs nucléaires, soit les récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), PXR (Pregnane X Receptor), FXR (Farnesoid X Receptor), LXR (Liver X Receptor), (Liver X Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), TR (Thyroid Hormone Receptor), RAR (Retinoic Acid Receptor), CAR (Constitutive Androstane Receptor).

Le récepteur RXR joue son rôle de régulation de la fertilité et de la reproduction essentiellement *via* l'hétérodimérisation avec les récepteurs RAR et PPAR. Ainsi, l'hétérodimère RXR/PPAR contribue au développement et à la maturation des ovocytes et des spermatozoïdes, et l'hétérodimère RXR/RAR est impliqué dans la spermatogenèse, notamment par la détermination du sexe du gamète, qui va se développer en un

spermatogonium ou un ovocyte selon le signal envoyé. Il est à noter que les souris KO pour le récepteur RXR sont stériles.

L'hétérodimérisation du récepteur RXR aux autres récepteurs déjà décrits est essentielle à de nombreux aspects du développement fœtal et embryonnaire, en particulier la morphogenèse cardiaque et la différenciation hépatique. Le développement cérébral est fortement dépendant de l'activité de l'hétérodimère RXR/TR.

L'hétérodimérisation du récepteur RXR avec le récepteur PPAR régule le métabolisme des acides gras poly-insaturés, l'hétérodimère RXR/LXR régule celui des oxystérols, et l'hétérodimère RXR/FXR celui des acides biliaires.

3. La perturbation de la voie de signalisation des acides rétinoïques

En comparaison avec celle des autres axes, la perturbation de la voie de signalisation des acides rétinoïques est relativement bien documentée chez l'homme et le rongeur. Elle implique la réduction des réserves endogènes en acides rétinoïques ou la fixation, agoniste ou antagoniste, d'un xénobiotique aux récepteurs des rétinoïdes.

La fixation au récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) de ligands tels que certains PCDD (Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins), PCDF (Polychlorinated Dibenzofurans), ou PCB, a la capacité, sans que le mécanisme impliqué ne soit parfaitement décrit, d'induire la déplétion des réserves endogènes en acides rétinoïques (Zhang et al., 2012) .

De nombreux composés retrouvés comme polluants environnementaux ont été identifiés *in vitro* en tant qu'agonistes des différents récepteurs RAR humains (Ex : 4-nonylphenol, Aldrin, Chlordane, dieldrin, endosulfan). Ce sont par contre des agonistes très faibles en comparaison avec les rétinoïdes endogènes, avec un potentiel relatif d'activation allant environ de 0.01% à 1% de l'activité des acides trans-rétinoïques (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

L'agoniste exogène le plus puissant connu du récepteur RXR est le tributylétain. Il active non seulement le récepteur RXR à concentration nanomolaire *in vitro*, mais active

également les récepteurs nucléaires PPAR γ , PPAR δ , LXR α , et NURR1, qui forment des hétérodimères avec le récepteur RXR. Les conséquences de cette activation sont principalement la perte de l'homéostasie des lipides. Chez le rat, l'exposition au tributylétain provoque en outre la différenciation des cellules souches multipotentes en adipocytes. D'autres composés organostanniques, le tétrabromobisphénol, ou le pentachlorophénol, ont un pouvoir agoniste faible bien important que celui du tributylétain, sur le récepteur RXR.

E. Voie de signalisation de la vitamine D

1. Description

La vitamine D, ou 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, est une hormone stéroïde dont l'action est conditionnée par la fixation au récepteur nucléaire VDR. Ce dernier forme alors un facteur de transcription après hétérodimérisation avec un récepteur RXR. Le dimère VDR/RXR se fixe sur les VDRE (Vitamin D Response Element) dans la région promotrice des gènes cibles. La voie de signalisation de la vitamine D est très conservée au cours de l'évolution.

Le rôle classique et prédominant de la voie de signalisation de la vitamine D est la régulation de la mobilisation du calcium et le maintien de son homéostasie par le contrôle de l'absorption intestinale du calcium et sur sa mobilisation à partir du réservoir osseux. Mais le fait que le récepteur VDR soit exprimé dans 36 tissus différents indique une grande diversité d'action (Bergman et al., 2012).

La vitamine D est essentielle pour les phénomènes de développement et de remodelage osseux de par son rôle de contrôle de la différenciation des cellules souches osseuses en ostéoblastes ou en ostéoclastes, et de par le contrôle des fonctions de ces deux types cellulaires. L'absorption intestinale du calcium est également conditionnée par la signalisation dépendante du VDR.

Le VDR est en outre fortement exprimé dans de nombreuses cellules du système immunitaire telles les lymphocytes, les macrophages, ou les cellules dendritiques, dans les cellules cardiaques, et dans les structures nerveuses supérieures.

2. Perturbations de la voie de signalisation de la vitamine D

Il existe peu de mécanismes décrits de perturbation de la voie de signalisation de la vitamine D par des xénobiotiques. Le VDR est d'ailleurs un récepteur à haute spécificité de substrat, et un mécanisme de perturbation impliquant la fixation d'un PE au VDR est réputé peu probable (Wu et al., 2013). Les observations font plutôt état de liens entre l'exposition à des xénobiotiques et la perturbation de phénomènes physiologiques régulés par cette voie de signalisation, sans que les mécanismes ne soient bien identifiés.

Par ailleurs, plusieurs types de cancer, tels les cancers du côlon, du sein, ou de la prostate, sont associés à des déficits en vitamine D ou à des pertes de fonction du récepteur VDR (Matsunawa et al., 2009).

La toxicité de la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) a été décrite dans un nombre important d'études, et a été décrite comme médiée par l'activation du récepteur AhR. L'exposition de souris en développement à la TCDD entraîne des malformations squelettiques et un défaut de minéralisation osseuse, en même temps qu'un doublement de la concentration circulante de la forme active de la vitamine D (Nishimura et al., 2009). Or, la régulation de l'expression des CYP27B1 et CYP24A1, les deux principales enzymes impliquées dans le maintien de l'homéostasie de la vitamine D, est dépendante du récepteur AhR (Matsunawa et al., 2009; Nishimura et al., 2009).

L'action de l'éthanol, connu pour altérer l'homéostasie, la composition, et la résistance osseuse chez l'humain et le rat, est médiée par le récepteur AhR (Zhang et al., 2012). L'administration chronique d'alcool chez le rat provoque la diminution de la 25-hydroxyvitamin D₃ circulante en raison d'une diminution d'expression du CYP27B1 et d'une augmentation d'expression du CYP24A1 (Shankar et al., 2008).

La perturbation chez l'homme de la voie de signalisation de la vitamine D par les xénobiotiques actifs *via* le récepteur AhR est ainsi une hypothèse forte.

F. Voie de signalisation du récepteur PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)

1. Les récepteurs PPAR

Les récepteurs PPAR sont des récepteurs nucléaires localisés dans le noyau. On trouve trois récepteurs PPAR distincts chez les mammifères, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2), et PPAR γ (NR1C3). Chacun d'eux s'hétérodimérise avec le récepteur RXR pour former un facteur de transcription. Les principales fonctions des différents récepteurs PPAR et ont résumées tableau II-2. Y figurent également les différents sites d'expression de chacun d'entre eux. Physiologiquement, les ligands des récepteurs PPAR sont les acides gras.

Tableau II-2. Localisation et rôle des récepteurs PPAR. D'après Bergman et al. 2012.

PPAR	Expression	Implication
PPARα	Foie, intestin, rein, cœur, tissus adipeux.	Facilitation de la prolifération du péroxysome, du catabolisme des acides gras, de l'apparition du cancer du foie et de retard de développement. Altère l'homéostasie des lipides, inhibe l'inflammation
PPARβ/δ	Ubiquitaire, mais plus importante dans l'épithélium intestinal, le foie, et les kératinocytes.	Augmente le métabolisme des acides gras, facilite la prolifération et la différenciation cutanée, facilite le développement placentaire.
PPARγ	Large variété de tissus à faible bruit, tissus adipeux, macrophages.	Facilite la différenciation des hépatocytes, l'homéostasie du glucose, contrôle l'invasion trophoblastique et l'angiogenèse placentaire, réprime l'inflammation.

Dans le foie, PPAR α contrôle la β -oxydation dans le péroxysome et la mitochondrie, et l' ω -oxydation dans le réticulum endoplasmique. L'activation de PPAR α entraîne alors la réduction de la quantité de VLDL (Very Low Density Lipid) et l'augmentation de celle de HDL (High Density Lipid), et réduit la durée de l'inflammation induite par les macrophages. L'activation de PPAR β/δ augmente la tolérance au glucose et permet la différenciation de la peau et des intestins.

2. Perturbation de la voie de signalisation du récepteur PPAR

Les récepteurs PPAR, qui régulent l'homéostasie lipidique et énergétique, sont la cible potentielle de polluants environnementaux, et ont potentiellement une part de responsabilité dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité.

Les principaux xénobiotiques actifs sur les récepteurs PPAR sont résumés dans le tableau II-3.

a. Perturbation du récepteur PPAR α

Les activateurs de PPAR α sont considérés comme bénéfiques pour la santé humaine, notamment grâce à des propriétés anti-inflammatoires sur le système cardio-vasculaire. Leur capacité à réduire les niveaux plasmatiques de triglycérides et la masse adipeuse explique l'utilisation de certains d'entre eux en thérapeutique. Cependant, des effets secondaires sont connus pour cette classe de médicaments. Dans certains cas, ils entraînent des troubles métaboliques à l'origine de souffrance musculaire, voire de rhabdomyolyse, ou entraînent une cytolysse hépatique. Chez les rongeurs, il a été décrit que le traitement par des médicaments de la classe des « fibrates » peut aboutir à l'apparition d'un cancer du foie, sans que la pertinence pour l'homme de cette observation ne soit connue (Rao and Reddy, 1987). Il a d'ailleurs été récemment proposé que les activateurs du PPAR α soient protecteurs vis-à-vis de l'hépatocarcinogénicité *via* l'activation de la voie de signalisation de Nf- κ B (Zhang et al., 2014).

b. Perturbation via le récepteur PPAR β/δ

Chez la souris, les agonistes de PPAR β/δ protègent du gain de poids et de la perte de sensibilité à l'insuline induits par un régime hyper lipidique, probablement en raison de l'augmentation du catabolisme musculaire des acides gras et de la thermogénèse (Wang et al., 2003). L'effet protecteur des agonistes de PPAR β/δ vis-à-vis du syndrome métabolique induit par une alimentation déséquilibrée semble se confirmer chez l'humain (Cariou et al., 2011). Dans les deux cas, la diminution des LDL et VLDL est accompagnée par une augmentation des HDL.

Table II-3. Principaux xénobiotiques actifs sur les récepteurs PPAR. D'après Bergman et al. 2012

Composé	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
1-palmityl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphocholine	x		
Acides gras saturés (C14:0-C18:0)	X	X	
Acides gras insaturés ω -3 (C18-22)	X	X	x
Acides gras insaturés ω -6 (C18-20)	X	x	x
Acides gras insaturés ω -9 (C16-18)	X	X	
Prostaglandine J2			X
Leukotriène B4	x		
Ceramide		x	
Acide 8-hydroxyeicosapentanoïque	X		
Acide Phtalique	X		
Médicaments hypolipémiants			
• Acide clofibrrique	X		
• Acide Ciprofibrrique	X		
• Gemfibrozil	X		
• Wy-14,643	X		
• Acide eicosatetranoïque	X	x	
• Acide benzafibrrique		X	X
• GW501516		X	
Indomethacine			X
Ibuprofène			X
Troglitazone			X
Rosiglitazone			X
Pioglitazone			X
Inhibiteurs des fatty acyl dehydrogenase	X		
Inhibiteurs de la carnitine palmitoyl transferase I	X		
Phtalates	X		
Mono-2-ethylhexylphtalate			X
Acides dichloro- et trichloro-acétique	X		
Tributylétain			X
Triphenylétain			X
Analogues halogénés du Bisphénol A			X

c. Perturbation via le récepteur PPAR γ

La stimulation du récepteur PPAR γ est probablement le mode de perturbation de la voie de signalisation des récepteurs PPAR le plus critique en termes de risque d'apparition d'effets néfastes sur la santé. En effet, bien qu'avantageusement utilisés en traitement du diabète insulino-indépendant, les médicaments agonistes de PPAR γ ont pour effet secondaire fréquent la prise de poids à long terme. Les composés organostanniques, notamment le tributylétain et le triphénylétain sont des agonistes puissants du récepteur PPAR γ . L'exposition à ces composés est associée chez l'homme et l'animal à l'obésité et à l'apparition de dépôts lipidiques, voire de plaques d'athérome (Kotake, 2012). Un autre mécanisme de perturbation de la signalisation dépendante du PPAR γ a été décrit. Le bisphénol A serait capable d'induire l'adipogenèse chez le rat, mais par l'induction de l'expression du récepteur PPAR γ (Somm et al., 2009).

III. Axe hypothalamus-Hypophyse-Thyroïde (HPT), Physiologie

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour de nombreuses fonctions physiologiques, et en particulier pour le neurodéveloppement, la croissance, et le métabolisme cellulaire. La décennie précédente a vu publier un nombre conséquent d'études dont la conclusion globale est qu'il existe un risque de perturbation de la fonction thyroïdienne par exposition à certains composés environnementaux. Les mécanismes mis en causes sont variés, puisque l'interaction agoniste et antagoniste avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes, la perturbation de la signalisation par la TRH, l'altération des processus qui concourent à la synthèse ou au métabolisme des hormones thyroïdiennes, ou encore la perturbation de leur transport, ont été décrites. Les produits chimiques susceptibles d'être à l'origine de telles perturbations sont ici désignés THDC, acronyme d'une appellation anglophone utilisée dans la littérature, « Thyroid Hormone Disrupting Compound ».

L'axe HPT est très conservé au cours de l'évolution, tant en ce qui concerne la synthèse hormonale, que le métabolisme des hormones ou leurs modes d'action. Ainsi, les études qui permettent d'améliorer l'état des connaissances, comme les tests de dépistage de la toxicité thyroïdienne des produits chimiques, sont fréquemment conduites sur des modèles animaux non mammaliens.

A. Description de l'axe HPT

Le schéma ci-dessous (Figure III-1) représente les organes impliqués dans l'homéostasie des hormones thyroïdiennes et dans la régulation de la réponse à ces hormones.

L'hypothalamus est la structure située le plus en amont de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde. Il module l'activité de l'hypophyse *via* la sécrétion de TRH (Thyrotropin releasing hormone) produite dans l'hypothalamus, mais dont la principale source est

constituée par les neurones du noyau paraventriculaire. La sécrétion de TRH est contrôlée par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et la voie nerveuse. La fixation des hormones thyroïdiennes à leurs récepteurs, au niveau de l'hypothalamus, diminue la sécrétion de TRH, ce qui constitue un mécanisme de rétrocontrôle négatif. La régulation par voie nerveuse de la sécrétion de TRH est conditionnée par divers paramètres physiologiques, tels la disponibilité en nourriture, la température corporelle, ou le fonctionnement cardiovasculaire (Greer et al., 1993). Cette hormone est acheminée vers l'hypophyse par un système porte. Elle a pour fonction la stimulation de la synthèse de TSH (Thyroid stimulating hormone ou thyrotropine) par l'hypophyse. Il est à noter que chez les téléostéens et certains amphibiens, la TRH n'a pas d'effet sur la sécrétion de TSH, qui est alors régulée par la corticotropin releasing hormone (CRH) (Larsen et al., 1998).

L'hypophyse est le second élément de la chaîne de régulation de l'axe HPT. Elle influe sur la thyroïde par le biais de la sécrétion de TSH. La TSH est un hétérodimère formé des sous-unités α et β . La sous-unité α est commune à la TSH, la FSH, la LH, et la CG. La sous-unité β confère à la TSH sa spécificité pour son récepteur. La TRH module la sécrétion de TSH par l'hypophyse *via* le récepteur TRHR (TRH Receptor) qui est un récepteur plasmatique couplé à la protéine Gq. La fixation de la TRH au TRHR induit la phosphorylation de ce dernier, puis une activation de la phospholipase C, pour aboutir après la mise en œuvre de phosphorylations en chaîne à l'induction de la synthèse et de la libération de TSH. Les facteurs de transcriptions activés pour induire la synthèse de la sous-unité β de la TSH (TSH β) sont essentiellement CREB (cAMP-responsive element-binding protein) et Pit-1 (Hashimoto et al., 2000). La TRH influe également sur la glycosylation post-transcriptionnelle de la TSH, nécessaire à sa dimérisation, sa sécrétion et son activité (Furuhashi and Suganuma, 2003).

La glande thyroïde synthétise les hormones thyroïdiennes sous contrôle de la TSH qui se fixe au récepteur TSHR (TSH Receptor) situé sur la membrane plasmique du pôle basal des thyrocytes. Le TSHR est un récepteur couplé à la protéine Gs qui, en cas de fixation du ligand, stimule l'adénylate-cyclase et déclenche la cascade de phosphorylation de la PKA (Protein Kinase A). Il s'en suit la phosphorylation des facteurs de transcription CREB et CREM (cAMP-responsive element modulator) (Uyttersprot et al., 1999). La TSH active également la voie de la phospholipase C, ce qui a pour conséquence la modulation de la capture d'iode par le

thyrocyte, de l'iodation des résidus tyrosyl de la thyroglobuline (TG), de la synthèse et de l'oxydation de la TG, de la recapture de la TG par le thyrocyte, et de la production des hormones thyroïdiennes T_3 et T_4 . La T_4 (Tétra-iodo-thyronine ou thyroxine) est synthétisée en plus grande quantité que la T_3 (Tri-iodo-thyronine), alors que cette dernière est de loin la plus active des deux. L'anatomie et l'activité de la synthèse hormonale de la glande thyroïde seront davantage décrites dans un paragraphe spécifique.

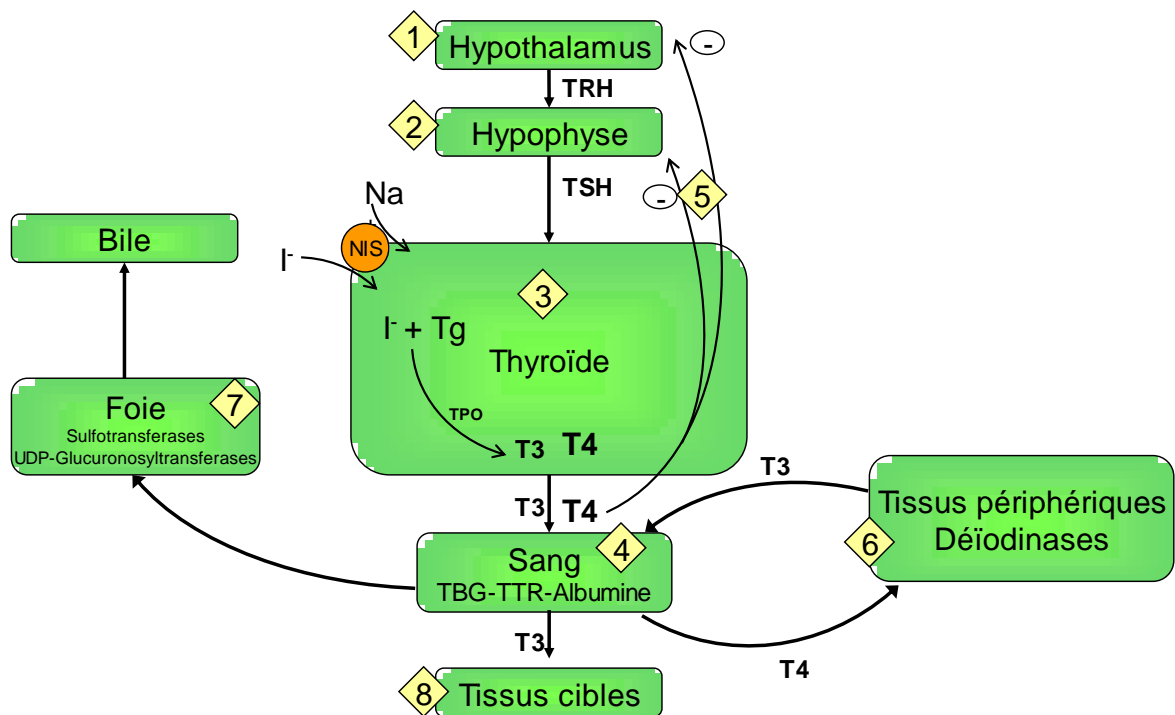


Figure III-1. Représentation schématique de l'axe HPT.

Une fois dans la circulation sanguine, les hormones thyroïdiennes se lient à des protéines. Chez l'homme, la T_4 circulante est à 75 % liée à la TBG (Thyroxin binding globulin), à 15 % à la TTR (Transthyrétine) et à 10 % à l'albumine. La fraction libre des hormones thyroïdiennes représente moins de 0,5% de la concentration sérique totale (Schussler, 2000). Il est intéressant de noter que la TBG est quasiment absente chez le rongeur adulte (OECD, 2006; Vranckx et al., 1990a; Vranckx et al., 1990b). Cette différence est

probablement à l'origine de la différence de sensibilité à certains THDC entre le rat et l'homme. L'importance quantitative de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques est un élément de régulation de la concentration de ces hormones au niveau des organes cibles, et participe également probablement à la régulation de la clairance de l'iode. Les protéines de transport sanguin permettent de rendre disponibles la T_3 et la T_4 pour tous les organes, y compris ceux responsables de la régulation de leur propre sécrétion. Elles exercent ainsi un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la TRH par l'hypothalamus et sur la sécrétion de la TSH par l'hypophyse.

La conversion périphérique de T_4 en T_3 par les ORD (Outer-ring deiodinases) de type I et II (Figure III-2) joue un rôle primordial pour l'intégrité de la fonction thyroïdienne au vu de la différence d'activité qui existe entre ces hormones. 80 % de la T_3 circulante serait produite par les ORD périphériques. L'expression des ORD est variable dans le temps et selon les organes, ce qui constitue un important mécanisme de modulation de la signalisation dépendante des hormones thyroïdiennes (Mullur et al., 2014).

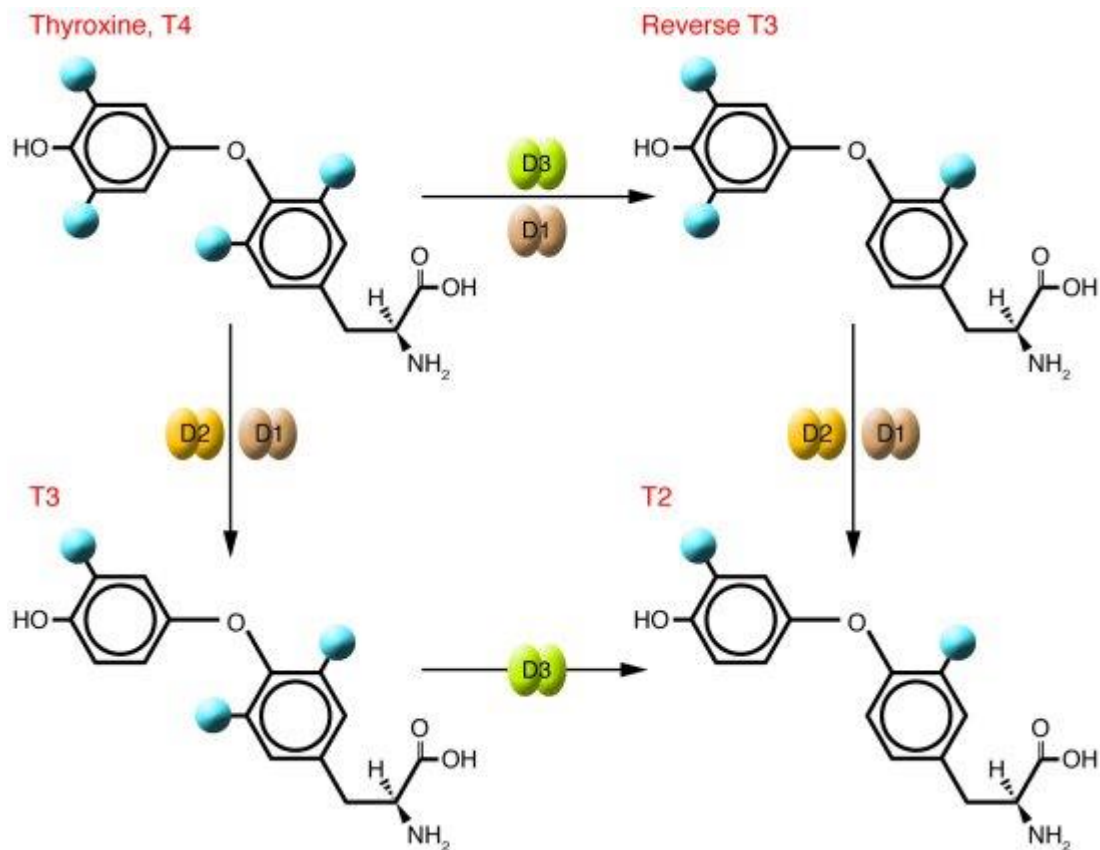


Figure III-2. Action des déiodinases sur les hormones thyroïdiennes. (D'après <http://www.jci.org>).

Les hormones thyroïdiennes sont éliminées de la circulation sanguine par voie biliaire après conjugaison dans le foie par des enzymes de phase II. Elles sont sulfonylées par les sulfotransférases ou glucuronylées par les UDP-GT ou UGT (Uridine diphosphate glucuronosyltransférase).

Les hormones circulantes intègrent les cellules cibles par diffusion passive à travers la membrane plasmique grâce à leur nature lipophile, ou bénéficient d'un transport actif et /ou facilité. La concentration intracellulaire peut ainsi être dix fois supérieure à la concentration circulante selon les tissus. Plusieurs récepteurs ont été identifiés, dont MCT8 (Slc16a2), OATP14 (Slco1c1) et OATP1 (Slco1a1). L'expression de chacun des transporteurs des hormones thyroïdiennes est variable selon les tissus et pourraient être important dans la modulation de la signalisation des hormones thyroïdiennes (Schweizer et al., 2014).

Une fois dans les cellules des tissus cibles, les hormones thyroïdiennes agissent *via* la stimulation de récepteurs nucléaires spécifiques aux hormones thyroïdiennes (TR). Il existe trois formes de récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes : TR α 1, TR β 1 et TR β 2, codées par deux gènes, c-erbA-alpha et c-erbA-béta. Ils forment des facteurs de transcription par hétérodimérisation avec le récepteur RXR. La T₃ se lie avec autant d'affinité sur chacun de ces récepteurs. L'affinité de la T₄ pour ces mêmes récepteurs est environ cinquante fois moins importante que celle de la T₃ (Webb et al., 2002). Là encore, l'expression de ces récepteurs est variable selon les tissus. Au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, le mécanisme de rétrocontrôle négatif est médié par la liaison de la T₃ au récepteur TR β qui réprime la transcription des gènes codant pour la TRH et la TSH respectivement.

B. La glande thyroïde : anatomie & organisation fonctionnelle

La glande thyroïde est composée de deux lobes situés de part et d'autre de la trachée, qui se rejoignent par un isthme situé contre la partie antérieure de cette dernière. La production des hormones thyroïdiennes s'effectue au sein des follicules. Ces structures sont composées d'un épithélium unistratifié qui emprisonne le colloïde, substance de laquelle dérivent les hormones thyroïdiennes. Les follicules sont soutenus par du tissu conjonctif dans lequel sont également incluses les cellules parafolliculaires, responsables de la sécrétion de calcitonine, et un réseau important de vaisseaux sanguins.

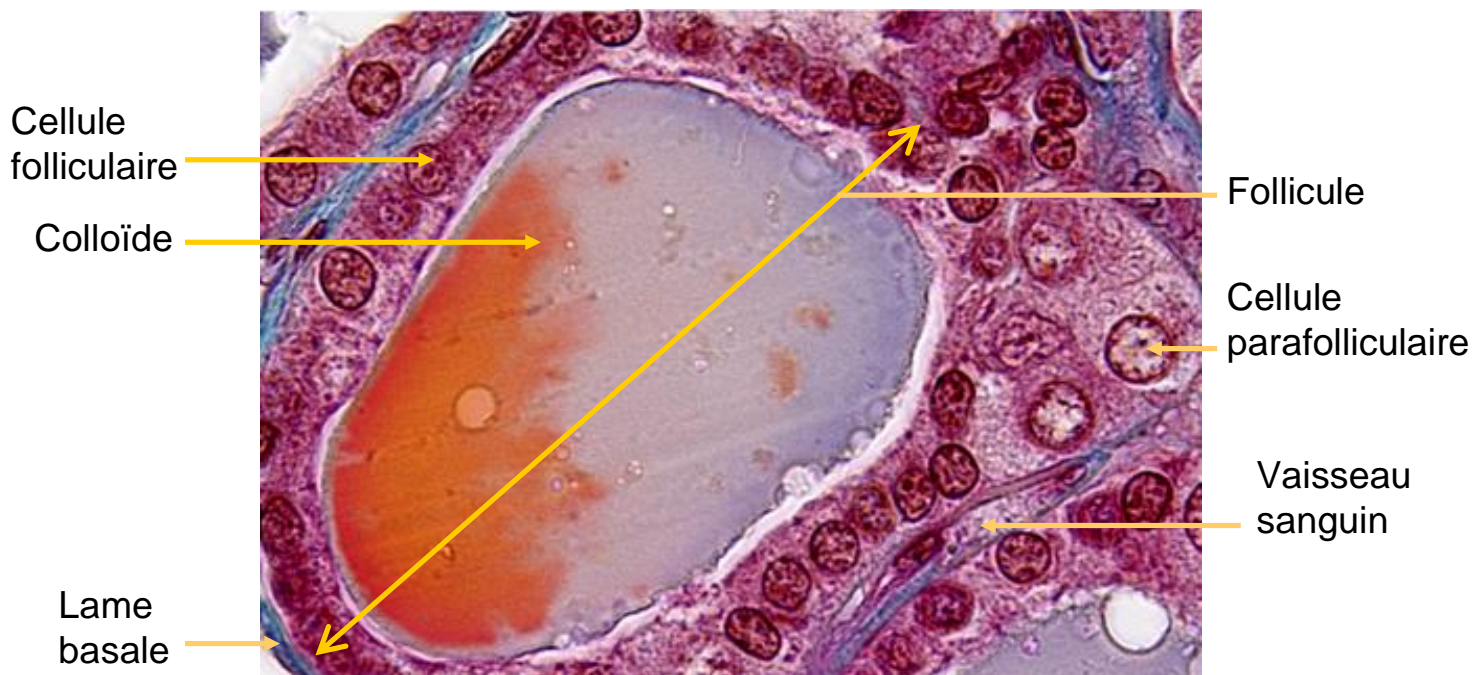


Figure III-3 : Follicule thyroïdien. Coloration : trichrome de Masson modifié Goldner, grossissement x 1000

L'architecture de la glande thyroïde est marquée par ses nombreux follicules, qui sont les unités fonctionnelles de la synthèse des hormones T_3 et T_4 . La figure III-3, dont le schéma est centré sur une cellule folliculaire, permet une vision d'ensemble des mécanismes qui contribuent à cette synthèse.

L'iodure est apporté par la circulation sanguine jusqu'à proximité de la membrane basolatérale des cellules folliculaires. Il est alors activement transporté par le symporteur sodium/iodure (NIS) qui utilise le gradient de concentration des ions sodium entre l'intérieur du thyrocyte et le milieu extracellulaire. Les ions iodure sont ainsi vingt à quarante fois plus concentrés dans la thyroïde que dans le sang. Le gradient de concentration des ions sodium est entretenu activement par l'échangeur sodium/potassium ATPase. La transcription du gène codant pour le NIS est dépendante des facteurs de transcription TTF1, TTF2, et Pax8, qui sont activée par la PKA, elle-même activée *via* la fixation de la TSH à son récepteur. Le NIS est également autorégulé, puisqu'une forte concentration intracellulaire en ions iodure inhibe l'expression de son gène (Leoni et al., 2008; Miot et al., 2000).

Les ions iodures rejoignent ensuite le colloïde par le canal chlore/iodure ou *via* un transporteur, la pendrine. Là, les ions iodures sont greffés aux résidus tyrosyls portés par la thyroglobuline (Tg). La Tg est entièrement synthétisée dans les ribosomes des cellules folliculaires et acheminée vers le colloïde par l'appareil de Golgi. Comme pour le NIS, la transcription du gène codant pour la Tg est régulée par les facteurs de transcription TTF1, TTF2, et Pax8, et dépend donc également de la stimulation de la thyroïde par la TSH. Une enzyme attachée à la membrane apicale des cellules folliculaires, la thyropéroxydase (TPO), oxyde les résidus tyrosyl et permet ainsi d'une part l'iodation et la formation de monoiodothyrosine (MIT) et diiodothyrosine (DIT), et d'autre part la formation d'une liaison éther (–O–) entre MIT et DIT ou entre deux DIT, qui forme les hormones thyroïdiennes. Ces réactions nécessitent une concentration suffisante de peroxyde d'hydrogène dans le colloïde, maintenue par les enzymes DUOX (Dual Oxydase) et ThOX (Thyroid NADPH Oxydase).

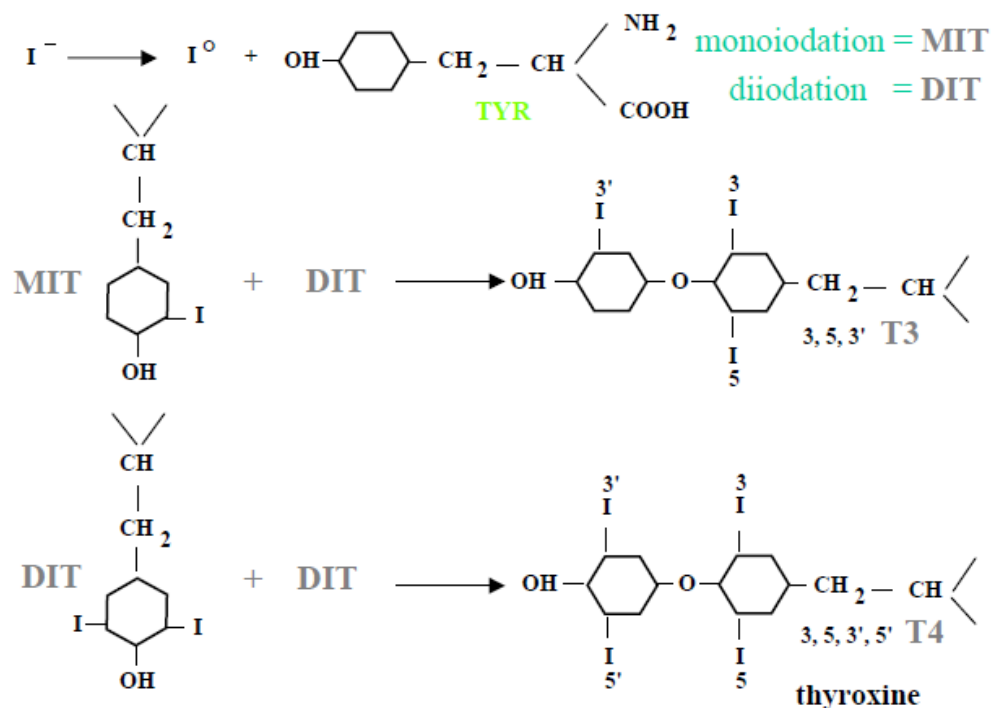


Figure III-4. Processus d'élaboration des hormones thyroïdiennes à partir de MIT et DIT. D'après (Miot et al., 2000).

Suite à cette réaction la Tg porte donc, selon le nombre d'atomes d'iode incorporé et le degré de polymérisation, des molécules de mono-iodothyronine (MIT), di-iodothyronine (DIT), triiodothyronine (T_3), ou tétraiodothyronine (T_4) (Figure III-4). Le stock de Tg iodée est important chez l'homme adulte, et correspondant à trois mois de synthèse de T_3 et T_4 (Marieb, 1993), tandis qu'il est faible chez le nourrisson. Il est également intéressant de noter que le rat, même adulte, ne possède pas de telles réserves et ne peut assurer que quelques jours de synthèse sans apport d'iode (OECD, 2006).

La Tg iodée quitte ensuite le colloïde par endocytose par les cellules folliculaires. L'endosome fusionne alors avec les lysosomes pour former le lysosome secondaire. Les enzymes lysosomales séparent les hormones de la Tg (Marieb, 1993) et les hormones peuvent ainsi être sécrétées.

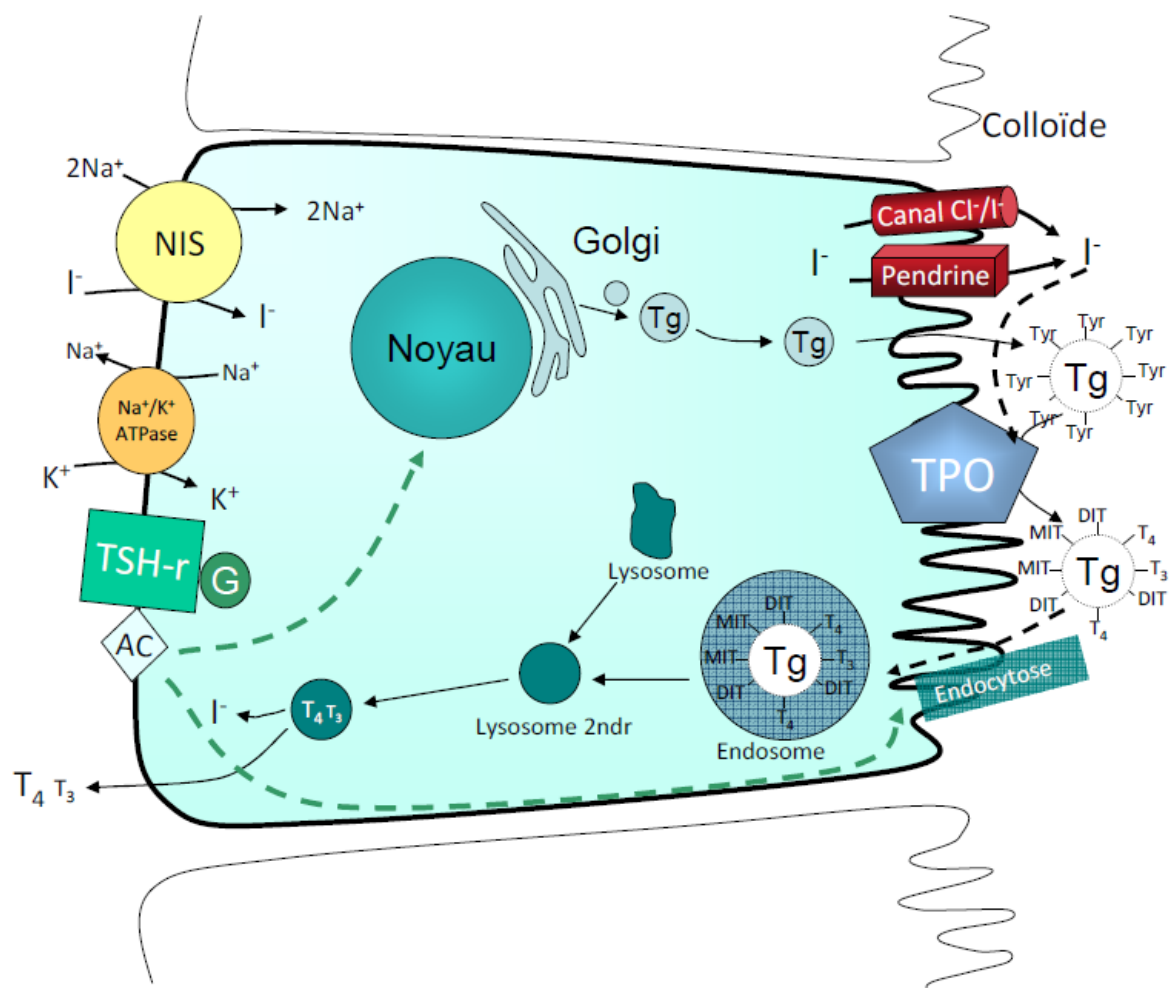


Figure III-5. Représentation schématique de la synthèse des hormones thyroïdiennes.

La régulation de la synthèse des hormones par la TSH est médiée par le récepteur membranaire (TSH-r), récepteur couplée à une protéine G qui active l'adénylate cyclase. La protéine kinase A (PKA) est alors activée, et le taux d'AMPc intracellulaire augmente. Cette voie de signalisation influe sur l'endocytose de la Tg, sur sa synthèse nucléaire et sur la prolifération cellulaire.

C. La perturbation de l'axe HPT

Donner une définition de ce qu'est un THDC n'est pas aisée. Classiquement, les biomarqueurs utilisés pour caractériser la perturbation de l'axe HPT sont les concentrations sanguines de T_4 et de TSH. L'étude de ces paramètres et les événements qui résultent de leur dérégulation ont permis d'établir des corrélations entre l'exposition à des THDC et la survenue d'une perturbation de l'axe HPT. Mais la mise en évidence de THDC environnementaux modifiant les concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes sans modifier celle de la TSH a remis en cause cette approche. De plus, certains composés ont la capacité d'agir directement sur les TR, ce qui laisse supposer l'existence de perturbations de la signalisation des hormones thyroïdiennes, sans effet sur la concentration des hormones elles-mêmes. Il est ainsi incontournable, lorsqu'il est question de dépistage d'éventuels THDC, d'étudier l'ensemble des cibles potentielles de perturbation de l'axe HPT.

En termes de conséquences, la perte de l'homéostasie des hormones thyroïdienne durant le développement neuronal est le risque le plus critique du fait d'atteintes irréversibles des fonctions supérieures. Le risque de retard mental et de perte des fonctions cérébrales par les fœtus, en cas d'anomalies de la concentration sanguine des hormones thyroïdiennes chez la mère gestante, a conduit à un dépistage en routine du taux de ces hormones dans toutes les régions du globe (Bergman et al., 2012). La figure III-5 présente de façon schématique le déroulement de la gestation, chez le rongeur et l'être humain, du point de vue de la dépendance du neurodéveloppement vis-à-vis des hormones thyroïdiennes. La variabilité des effets selon la période et la durée de la perte d'homéostasie rend difficile l'évaluation des risques représentés par de potentiels perturbateurs de la fonction thyroïdienne. Les effets neurodéveloppementaux sont observés pour des déficits en

hormones thyroïdiennes de faible intensité, soit une diminution de l'ordre de 25% par rapport à l'état physiologique, même si ces valeurs ne sortent pas de la norme de la population (hadow obregon). Chez le rongeur adulte, un déficit sévère en hormones thyroïdiennes peut également être dommageable pour le développement neuronal (Chen 2010).

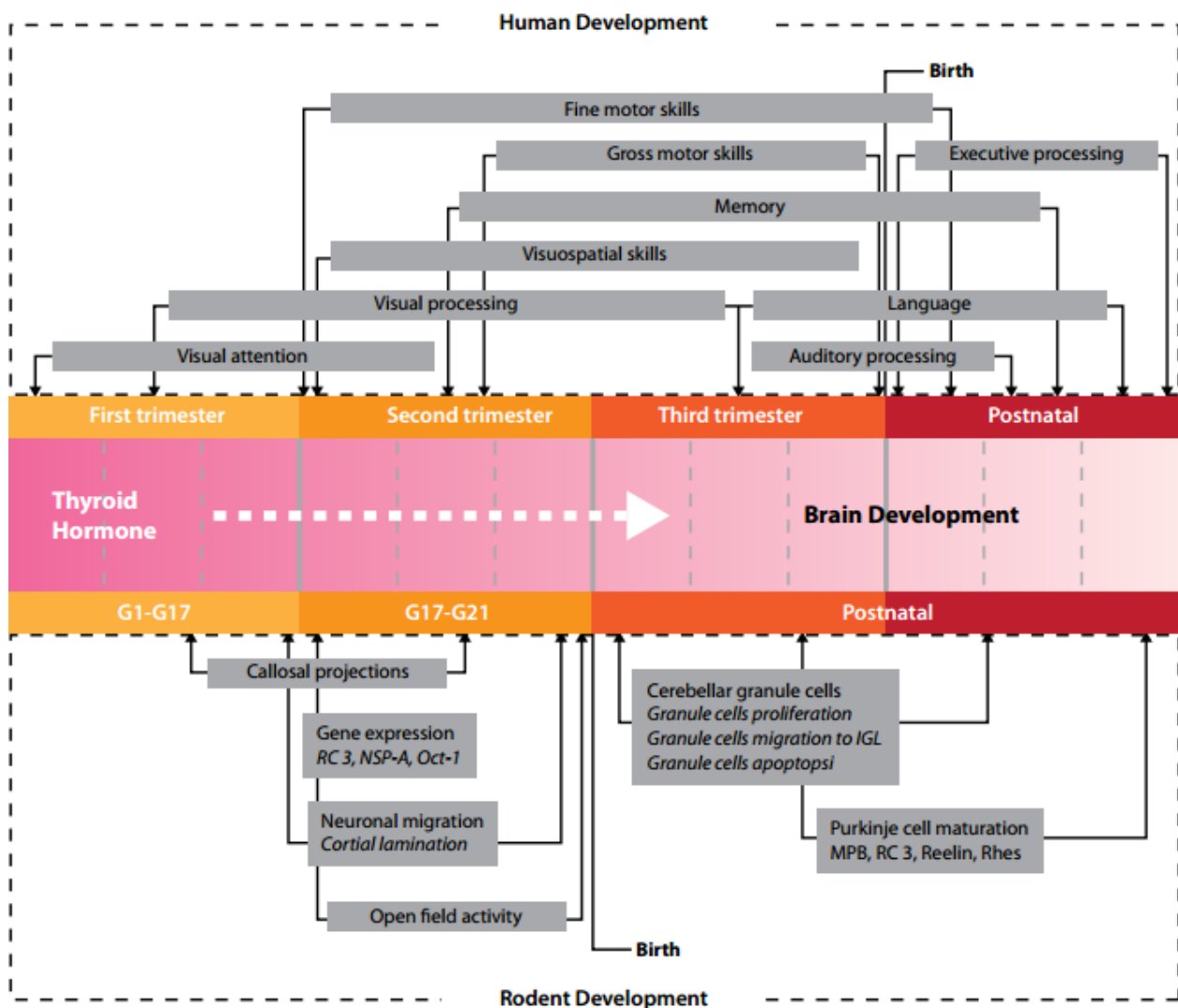


Figure III-6. Relation entre l'action des hormones thyroïdiennes et le développement du cerveau. Au cours du premier trimestre de grossesse, la prolifération et la migration des neurones est sous la dépendance de la T_4 maternelle. A partir du second trimestre, l'axe hypothalamo-hypophysaire du fœtus est fonctionnel, et la sécrétion de TSH engendre le début de la production des hormones thyroïdiennes par le fœtus. Il en résulte une augmentation de l'occupation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes par la T_3 . Ainsi, durant les second et troisième trimestres, le développement du cerveau est sous la double dépendance des hormones thyroïdiennes maternelles et fœtales. Après la naissance, le développement du cerveau est sous l'entière dépendance de la production d'hormones thyroïdiennes par le nouveau-né. D'après (Bergman et al., 2012).

Chez l'homme enfant ou adulte, les pathologies thyroïdiennes sont très fréquentes. Si les atteintes congénitales représentent une part non négligeable, nombreuses sont les pathologies thyroïdiennes à pouvoir être causées, au moins en théorie, par des xénobiotiques. Parmi elles, l'hypothyroïdie désigne un fonctionnement anormalement bas de la glande thyroïde qui ne produit alors pas les hormones thyroïdiennes en quantité suffisante. Ses symptômes sont divers et non spécifiques, tels l'intolérance au froid, l'état léthargique, la lenteur mentale. Des maladies thyroïdiennes auto-immunes peuvent aussi être provoquées par des atteintes environnementales, par une modification des interactions entre cellules de la glande thyroïde et système immunitaire (Klecha et al., 2008; Zoeller, 2010). Même si le cas de symptômes mimant une hyperthyroïdie provoquée par l'exposition à des xénobiotiques n'a pas été décrit, il est possible d'imaginer l'existence d'un agoniste puissant vis-à-vis des récepteurs TR qui en soit responsable. Ces symptômes sont généralement non spécifiques, comme l'intolérance à la chaleur, l'hyper-irritabilité, les troubles du sommeil, la perte de poids sans lien avec une modification du régime alimentaire, ou les troubles musculaires. Enfin, il a été reporté à plusieurs reprises l'induction chimique d'un goitre, que l'on peut considérer comme la conséquence de l'hyper-activation de la glande thyroïde (Wolff, 1998).

1. Perturbation de la signalisation de la TRH et de la TSH

Tous les THDC dont la perturbation influe sur les concentrations circulantes d'hormones thyroïdiennes sont susceptibles de moduler la sécrétion de la TRH et de la TSH par le mécanisme de rétrocontrôle que les hormones exercent sur l'hypothalamus et l'hypophyse. De même, il ne serait pas surprenant que les THDC qui ont une action directe sur les TR agissent sur la sécrétion de TRH et TSH. Même si la documentation du mécanisme est largement insuffisante, il semblerait que des THDC aient la capacité de perturber la production de TRH au niveau de l'hypothalamus, résultant en une hypothyroïdie. (OECD, 2012a; Patrick, 2009). Par ailleurs, le 1,1-bis-(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane, ou DDT, l'Aroclor 1254, et la mélisse officinale ont montré leur capacité à inhiber la production d'AMPC induite par la TSH dans le modèle cellulaire CHO (cellules ovariennes de hamster chinois) (Santini et al., 2003). Le DDT exerce en outre, toujours dans les cellules CHO, un effet inhibiteur sur la signalisation de la TSH en empêchant la mobilisation du TSHR (De

Gregorio et al., 2011). Ces observations *in vitro* n'ont pas été confirmées *in vivo* par l'observation d'hypothyroïdies induites par l'Arochlor 1254.

2. Toxicité directe sur la glande thyroïde

La glande thyroïde, et plus particulièrement le follicule qui est son unité fonctionnelle en ce qui concerne la synthèse des hormones thyroïdiennes, représente une cible privilégiée de perturbation endocrinienne. La figure III-5 schématise les différentes étapes de la synthèse des hormones et de sa régulation. Ces étapes sont autant de sources de dysfonctionnement du processus, et il convient de se demander si les produits connus comme toxiques vis-à-vis de la thyroïde sont susceptibles d'agir à tous les niveaux. En particulier, le NIS voit son activité inhibée par de nombreux composés anioniques comme le perchlorate, le thiocyanate, le bromate, ou le nitrate (Groef et al., 2006). Ces produits entrent en compétition avec les ions iodure pour la fixation au NIS, et diminuent ainsi l'incorporation de l'iode par le thyrocyte. Les PCB diminuent l'expression génique du NIS (Miller et al., 2009). La TPO est l'autre cible majeure de la perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Le propylthiouracyle (PTU), l'amirole, l'éthylenthionurée diminuent la synthèse des hormones thyroïdiennes, au moins en partie par ce mécanisme (Freyberger and Ahr, 2006; Katie B Paul et al., 2014a). Si le rôle de la pendrine n'a été formellement mis en cause dans aucun mécanisme d'action toxique connu, des travaux récents ont cependant permis d'avancer la possibilité de son implication dans la toxicité de l'excès d'iode (Calil-Silveira et al., 2012; Pesce et al., 2012) et du perchlorate {Attanasio, 2011 #192}. *In vitro*, il a été démontré que l'excès d'iode pouvait induire l'expression du gène codant pour la pendrine (Calil-Silveira et al., 2012).

3. Perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes

À elles trois, la thyroxine binding globulin (TBG, presque absente chez le rongeur), la transthyrétine (TTR) et l'albumine transportent la quasi-totalité (99.9%) des hormones thyroïdiennes chez le rongeur (Schussler, 2000). Le reste des hormones est sous forme libre. La toxicité vis-à-vis des protéines de transport a seulement été mise en cause (Brouwer et al., 1998), mais n'a pas été démontrée. Ce mécanisme d'action reste cependant à surveiller puisque des PCB, des retardateurs de flamme, des phtalates, et le penta-chlorophénol se

lient à la TTR et/ou à la TBG et entrent en compétition avec les hormones thyroïdiennes (Boas et al., 2006).

4. Perturbation du transport transmembranaire des hormones thyroïdiennes

Certains polybromodiphényléthers (PBDE, retardateurs de flammes) agissent directement sur l'expression du transporteur MCT8 (Richardson et al., 2008), tandis que certains autres THDC peuvent également prendre pour cible d'autres transporteurs de la famille des OATP (Patrick, 2009).

5. Interactions avec les déiodinases périphériques

Les déiodinases périphériques ont une importance particulière pour la disponibilité des hormones thyroïdiennes, puisque 80% de la T₃ circulante est produite par ces enzymes à partir de la T₄. L'expression des déiodinases est variable et module la sensibilité des tissus aux hormones thyroïdiennes, notamment au cours du développement (OECD, 2006). En dépit de l'importance fonctionnelle des déiodinases, seulement un faible nombre de toxiques sont identifiés comme agissant par ce mécanisme (Crofton and Zoeller, 2005; Klammer et al., 2007). L'implication de ce mécanisme d'action dans l'apparition de conséquences délétères observables n'est pas documentée (Klaassen et Hood, 2001).

6. Altération de la réponse par action sur les organes cibles des hormones thyroïdiennes

Plusieurs études ont montré que des métabolites du bisphénol A (BPA) et certains PCB (polychlorinated biphenyls) influent *in vitro* sur la transcription de gènes rapporteurs, dépendante de la fixation du dimère TR/RXR (Thyroid hormone receptor/ retinoid X receptor) sur le TRE (Thyroid hormone response element) (Boas et al., ; Crofton et Zoeller, 2005) (Zoeller, 2005). Le tetrabromobisphenol A, le tetrachlorobisphenol A, le tetramethylbisphenol A, et le 3,3'-dimethylbisphenol A ont montré leur capacité à entrer en compétition avec la T₃ pour la liaison au TR, dans un essai de transactivation utilisant des cellules CHO transfectées avec le TR humain, sans toutefois transactiver le gène rapporteur (Birnbaum and Staskal, 2004). Certains phtalates ont quant à eux montré des propriétés agonistes vis-à-vis du TR *in vitro* (Shen et al., 2009).

7. Métabolisme des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont éliminées par différentes voies. Leur importance quantitative respective en situation physiologique est mal connue.

Les déiodinases sont responsables de la conversion de la T_4 en T_3 (par les ORD à hauteur de 80% de l'hormone circulante), reverse T_3 , T_2 et T_1 . Ces trois dernières formes sont inactives. Il a été montré que des xénobiotiques peuvent moduler l'activité déiodinase de certains tissus (Klammer et al., 2007) (Hood et Klaassen, 2000b), mais aucun lien de causalité n'a été établi entre un effet toxique et ce mécanisme d'action.

La désamination oxydative puis la décarboxylation aboutit à l'élimination fécale et urinaire de dérivés acétiques (acide tri-iodoacétique (Triac) et tétra-iodoacétique (Tétrac)) d'une part, et de tri-iodothyronamine et de tétra-iodothyronamine d'autre part. Ces déchets du catabolisme peuvent subir une désiodation permettant à l'organisme de recycler l'iode (Zoeller et al., 2005).

Enfin, une partie des hormones thyroïdiennes est éliminée par voie biliaire après conjugaison par des enzymes de phase II. La T_3 et la T_4 sont sulfoconjuguées par les sulfotransférases ou glucuronoconjuguées par les UDP-Glucuronosyltransférases (UDP-GT). Certains toxiques ont été décrits comme modulant l'activité sulfotransférase hépatique (Wang et James, 2006; Zhou et al., 2011). C'est le cas également pour les UDP-GT (Barter et Klaassen, 1992). Les isoformes d'enzymes induites déterminent l'hormone principalement éliminée. L'augmentation préférentielle de la clairance de la T_3 engendre une toxicité différente d'une induction ciblée davantage sur la T_4 (Hood et Klaassen, 2000a). Dans les deux cas, on parle alors de toxicité indirecte médiée par le foie, en opposition avec les mécanismes de toxicité thyroïdienne directs dont l'action est initiée sur la glande thyroïde elle-même.

Il existe quatre familles d'isoformes d'UDP-GT chez les mammifères (Mackenzie et al., 2005). Les différentes isoformes qui les composent varient d'une espèce à l'autre.

- La famille UGT 1 est composée des sous-familles 1A et 1B qui comprennent respectivement 13 et 2 membres. Les UGT 1B sont très mal connues chez les mammifères, alors que la sous-famille 1A est classiquement décrite comme responsable de la glucuronidation des hormones thyroïdiennes et particulièrement de la T_4 (Richardson et Klaassen).
- La famille UGT 2 est elle aussi composée de sous-familles A et B. La première comporte trois membres alors que pour la seconde, près d'une quarantaine d'isoformes ont été décrites entre les différentes espèces. Il n'est ainsi pas surprenant que les UGT 2B soient responsables de la conjugaison de nombreux substrats. Il est à noter que l'UGT 2B1 du rat possède *in vitro* une forte activité de glucuronidation de la T_4 (Pritchard et al., 1994). L'UGT 2B2 est quant-à-elle responsable d'une grande partie de la conjugaison de la T_3 (Visser, 1996) (Beetstra et al., 1991).
- Les deux familles UGT 3 et UGT 8 sont de découverte plus récente et ne comportent que peu de membres dont les activités biologiques sont encore inconnues.

Des études récentes ont avancé l'idée qu'en plus de la simple induction d'enzymes de phase II, l'augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes induite par l'administration de certaines substances pouvait être en partie due à l'augmentation de l'expression des transporteurs des hormones thyroïdiennes à la surface des hépatocytes (Kato et al., 2010). Ce phénomène serait susceptible de concentrer les hormones dans le foie, ce qui aurait le double effet de capturer les hormones circulantes et d'augmenter l'efficacité de la réaction de conjugaison.

8. Conclusion

La toxicité de la fonction thyroïdienne se caractérise donc par une grande variété de causes et de localisations des cibles. Les événements déclencheurs sont à la fois une toxicité directe sur les cellules de la thyroïde, la diminution de l'efficacité du transport sanguin des hormones, la diminution ou l'augmentation de leur transformation périphérique, ou encore l'induction des enzymes qui favorise leur élimination. Peu de cibles potentielles sont épargnées par l'existence de toxiques dirigées contre elles. Il est ainsi complexe de tester

l'effet des produits sur ces différents mécanismes a priori indépendants mais d'importance comparable dans le cadre du dépistage des PE.

IV. Le criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne : état de l'art et perspectives

L'environnement réglementaire est de plus en plus contraignant vis-à-vis de l'autorisation de commercialiser des produits chimiques potentiellement PE. Aussi, il est préférable d'être alerté le plus tôt possible au cours du développement d'une molécule, du risque pour le produit d'être classé PE, et ainsi ne pas être commercialisable. Une alerte précoce permet de ne pas laisser s'accroître des coûts de développement pour une molécule vouée à l'abandon. Nous considérerons ici comme tests de criblage les tests *in vitro* et les tests *in vivo* de court terme, allant jusqu'à un mois environ pour les plus longs d'entre eux.

Historiquement, la problématique des PE s'est d'abord orientée sur la perturbation des hormones sexuelles. Des tests spécifiquement conçus pour leur dépistage ont alors été mis en place, et sont aujourd'hui standardisés et réalisés en routine par les laboratoires. A l'heure actuelle, la majeure partie du criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne est réalisée grâce à l'analyse de paramètres qui sont venus se greffer aux tests de criblage de la perturbation des hormones sexuelles. Nous commencerons donc par étudier les moyens de dépister les composés perturbateurs des hormones sexuelles. L'exposé permettra à la fois d'avoir un aperçu de ce à quoi devrait ressembler une éventuelle batterie de tests de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, et de mieux comprendre les tests actuels qui permettent ce criblage.

A. Un exemple de batterie de tests : le criblage de la perturbation des hormones sexuelles

La perturbation des hormones sexuelles a été à l'origine de la prise de conscience du risque représenté par le nouveau type de toxicité qu'est la perturbation endocrine. Sa prise en compte dans les études précliniques a ainsi été initiée bien avant celle de la perturbation de la fonction thyroïdienne. Aujourd'hui, même si la batterie de tests *in vitro* et *in vivo* utilisée en routine pour le criblage de la perturbation des hormones sexuelles reste imparfaite et continue à faire l'objet de recherches, elle permet néanmoins de créer un certain nombre d'alertes précoces dont l'équivalent en matière de perturbation de la fonction thyroïdienne est inexistant. Ce chapitre propose ainsi de présenter la procédure de criblage précoce de la perturbation des hormones sexuelles afin de montrer les solutions qui ont été trouvées pour répondre à une problématique comparable à celle du criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne en termes d'enjeux et de complexité des mécanismes à prendre en compte.

Dans le cas des perturbateurs endocriniens, l'OCDE a établi un cadre conceptuel auquel se référer pour organiser le criblage. (Fig IV-1) Les tests sont organisés en différents niveaux classés par ordre de priorité. Les tests de niveau 2 sont destinés à dépister l'existence d'un danger représenté par l'exposition à la substance d'essai. Il s'agit de la capacité à induire un effet délétère, sans prendre en considération sa pertinence dans le cadre de l'utilisation prévue de la substance. Les tests de niveau 3 ont pour but de confirmer l'existence du danger pressenti, et de fournir une première indication au sujet du niveau de dose auquel le danger peut se réaliser *in vivo*. Les niveaux 4 et 5 permettent d'affiner la compréhension des éventuels mécanismes d'action toxiques mis en jeu et d'étudier la toxicité à long terme. Il est alors possible de déterminer les NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, plus haute concentration qui ne donne pas d'effet toxique), et LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level, plus faible concentration qui engendre un effet toxique), et ainsi définir une dose maximale admissible, c'est-à-dire une dose à laquelle l'exposition ne donne pas lieu à l'effet toxique étudié.

Annex 1.4 2011 OECD Revised Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters

The Conceptual Framework lists the OECD TGs and standardized test methods available, under development or proposed that can be used to evaluate chemicals for endocrine disruption. The Conceptual Framework is intended to provide a guide to the tests available which can provide information for endocrine disrupters assessment but is not intended to be a testing strategy. Furthermore, this Conceptual Framework does not include evaluation of exposure, however this should be included when deciding whether further testing is needed. Further information regarding the use and interpretation of these tests is available in GD 150 (*i.e.* this GD).

Mammalian and non mammalian Toxicology		
Level 1 Existing data and non-test information	<ul style="list-style-type: none"> Physical & chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests. Read across, chemical categories, QSARs and other <i>in silico</i> predictions, and ADME model predictions 	
Level 2 <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s) (Mammalian and non mammalian methods)	<ul style="list-style-type: none"> Estrogen or androgen receptor binding affinity Estrogen receptor transactivation (OECD TG 455) Androgen or thyroid transactivation (If/when TGs are available) Steroidogenesis <i>in vitro</i> (OECD TG 456) MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist) Other assays as appropriate 	
	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s) ¹	<ul style="list-style-type: none"> Uterotrophic assay (OECD TG 440) Hershberger assay (OECD TG 441) 	<ul style="list-style-type: none"> Xenopus embryo thyroid signalling assay (When/if TG is available) Amphibian metamorphosis assay (OECD TG 231) Fish reproductive screening assay (OECD TG 229) Fish screening assay (OECD TG 230) Androgenized female stickleback screen (GD 140)

<p>Level 4</p> <p><i>In vivo</i> assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints²</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Repeated dose 28-day study (OECD TG 407) • Repeated dose 90-day study (OECD TG 408) • 1-generation reproduction toxicity study (OECD TG 415) • Male pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i>this GD] Chapter C4.3)³ • Female pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i>this GD] Chapter C4.4)³ • Intact adult male endocrine screening assay (see GD 150 [<i>i.e.</i>this GD] Chapter Annex 2.5) • Prenatal developmental toxicity study (OECD TG 414) • Chronic toxicity and carcinogenicity studies (OECD TG 451-3) • Reproductive screening test (OECD TG 421 if enhanced) • Combined 28-day/reproductive screening assay (OECD TG 422 if enhanced) • Developmental neurotoxicity (OECD TG 426) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fish sexual development test (Draft OECD TG 234) • Fish reproduction Partial Lifecycle Test (when/If TG is Available) • Larval amphibian growth & development assay (when TG is available) • Avian reproduction assay (OECD TG 206) • Mollusc partial lifecycle assays (when TG is available)⁴ • Chironomid toxicity test (TG 218-219)⁴ • Daphnia reproduction test (with male induction) (OECD TG 211)⁴ • Earthworm reproduction test (OECD TG 222, 2004)⁴ • Enchytraeid reproduction test (OECD TG 220, 2004)⁴ • Sediment water lumbriculus toxicity test using spiked sediment (OECD TG 225, 2007)⁴ • Predatory mite reproduction test in soil (OECD TG 226, 2008)⁴ • Collembolan reproduction test in soil (TG OECD 232, 2009)⁴
<p>Level 5</p> <p><i>In vivo</i> assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism²</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extended one-generation reproductive toxicity study (OECD TG 443)⁵ • 2-Generation reproduction toxicity study (OECD TG 416 most recent update) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fish lifecycle toxicity test (FLCTT) (when TG is available) • Medaka multigeneration test (MMGT) (when TG is available) • Avian 2 generation reproductive toxicity assay (when TG is available) • Mysid lifecycle toxicity test (when TG is available)⁴

Figure IV-1. Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. (Extrait de OECD, 2010).

1. Tests *in vitro*

Les tests de criblage *in vitro* (de niveau 2 dans le cadre conceptuel de l'OCDE, et niveau I selon le programme EDSP de l'US-EPA) pour la perturbation des hormones sexuelles ciblent la liaison, agoniste ou antagoniste, des xénobiotiques sur les récepteurs spécifiques à ces hormones, et l'inhibition de la synthèse hormonale. Les tests recommandés par l'OCDE sont les suivants (OECD, 2012a, 2012b) :

- Test de transactivation du récepteur nucléaire aux oestrogènes (ER transactivation assay, ligne directrice TG 455), et test de liaison au récepteur des oestrogènes (ER binding assay, ligne directrice de l'US EPA, OPPTS 890.1250) ;
- Test de liaison au récepteur des androgènes (AR binding assay, ligne directrice de l'US EPA, OPPTS 890.1150)

- Test d'inhibition de l'aromatase (Aromatase (Human Recombinant), OPPTS 890.1200), qui cible la conversion de la testostérone en oestrogène ; et test d'inhibition de la stéroïdogénèse (Steroidogenesis (Human Cell Line – H295R, OPPTS 890.1550) qui cible toute perturbation de la voie de synthèse des hormones stéroïdes ;
- Test de transactivation du récepteur nucléaire de la progestérone (PR transactivation assay).

L'EPA, *via* son programme EDSP (Endocrine Disruptors Screening Program), recommande une batterie de tests qui ne prend pas en compte la perturbation de la voie de signalisation des gestagènes autrement que par la perturbation de la synthèse des stéroïdes (EPA, n.d.; Stump et al., 2014).

Chacun de ces groupes de tests *in vitro* forment une batterie opérationnelle utilisable à haut débit, qui permet l'identification du potentiel des substances testées à être des perturbateurs de l'axe HPG.

2. Tests *in vivo*

Alors que tous les tests présentés ci-dessous appartiennent au premier niveau de test pour l'US-EPA, seuls deux d'entre-eux appartiennent au troisième niveau du cadre conceptuel de l'OCDE, niveau qui correspond aux tests *in vivo* qui ne ciblent qu'un unique mode d'action ou effet :

- Bio-essai utérotrophique chez le rongeur (TG 440 / OPPTS 890-1600). Cet essai *in vivo* permet le dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques ou anti-oestrogéniques des substances d'essai. Il est basé sur l'augmentation du poids utérin ou de la réponse utérotrophique chez des animaux dans lequel l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien n'est pas fonctionnel, à savoir des femelles immatures après sevrage et avant la puberté, ou de jeunes femelles adultes ovariectomisées, pour lesquelles la régression des tissus utérins est terminée. Chaque groupe d'animaux traités ou de contrôle comprend au moins 6 animaux qui reçoivent le traitement ou le placebo préférentiellement

par injection sous-cutanée, ou par gavage oral. Le plan d'étude expérimentale doit prévoir un minimum de deux groupes de dose différents pour chaque substance d'essai, et le traitement est administré au minimum trois jours consécutifs. Les animaux sont autopsiés approximativement 24 heures après la dernière dose. Le paramètre mesuré est le poids de l'utérus, qui augmente en cas d'exposition à un composé oestrogénique, et diminue en cas d'exposition à un composé anti-oestrogénique.

- Bio-essai de Hershberger sur le rat (TG 441 / OPPTS 890-1400). Ce test permet le dépistage *in vivo* à court terme de substances d'essai agonistes et antagonistes d'androgènes ou inhibitrices de la 5 α -réductase, enzyme du métabolisme de la testostérone. Le dépistage des substances androgéniques nécessite un minimum de deux groupes de doses de la substance d'essai, plus un témoin positif et un témoin de véhicule (négatif), tandis que trois groupes de doses de la substance d'essai sont requis pour dépister les anti-androgènes. Les groupes d'animaux comprennent chacun six animaux minimum. La substance d'essai est administrée quotidiennement pendant 10 jours consécutifs, préférentiellement par injection sous-cutanée, ou par gavage oral. Pour tester les anti-androgènes, la substance d'essai est administrée avec un agoniste d'androgène de référence. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après la dernière administration de la substance d'essai. Les paramètres mesurés sont les variations de poids de cinq tissus dépendant des androgènes chez le rat mâle péri-pubertaire castré: la prostate ventrale, la vésicule séminale, les muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux, la paire de glandes de Cowper, et le gland. Une augmentation (pour les androgènes) ou une diminution (pour les anti-androgènes) du poids de deux des cinq tissus, statistiquement significative, indique une réponse positive dans cet essai.

Les autres tests *in vivo* recommandés pour dépister les perturbateurs de l'axe HPG ciblent chacun plusieurs modes d'action ou types de perturbation, et appartiennent donc au

quatrième niveau du cadre conceptuel de l'OCDE, tout en restant pratiqués dans une optique de criblage, et donc au premier niveau de test selon l'US-EPA :

- Bio-essai d'évaluation du développement pubertaire et de la fonction thyroïdienne chez le rat mâle péripubertaire (Male PP Assay, ligne directrice de l'US-EPA OPPTS 890.1500). Ce test permet d'identifier les PE qui ont une influence sur la voie de signalisation des androgènes, sur celle des hormones thyroïdiennes, ou qui interfèrent avec la synthèse des hormones stéroïdes. Ce test peut aussi détecter les perturbations de l'axe HPG qui vont empêcher le bon déroulement de la puberté. Les PE qui interagissent avec la voie de signalisation sont aussi susceptibles de se traduire par des anomalies détectées par ce test. Les rats mâles sont exposés à la substance d'essai à partir de leur 23^{ème} jour, alors qu'ils ne sont pas encore sexuellement matures, et ce pendant 31 jours environs. Ils sont alors particulièrement sensibles aux modifications de concentrations d'androgènes. Le paramètre apical de ce test est la séparation préputiale (PPS), événement dépendant de la concentration en androgènes. L'âge auquel elle survient est déterminant quant au résultat du test. S'y ajoutent le poids corporel au moment de l'observation, puis le poids de différents organes (vésicules séminales, prostate ventrale, prostate dorso-latérale, épидидymes, testicules, muscles élévateur de l'anus et bulbo-caverneux, thyroïde, hypophyse, glandes surrénales). Les testicules, les épидидymes, et la thyroïde subissent un examen histopathologique, et les concentrations sériques des hormones thyroïdiennes et de la TSh sont mesurées. Ces paramètres permettent d'optimiser l'utilisation des animaux, d'étendre le test aux modes d'action moins spécifiques de la réponse aux androgènes, et de fournir des informations utiles à l'investigation de l'éventuel mode d'action toxique de la substance d'essai.
- Bio-essai d'évaluation du développement pubertaire et de la fonction thyroïdienne chez le rat femelle péripubertaire (Female PP Assay, ligne directrice de l'US-EPA OPPTS 890.1450). Ce test permet d'identifier les PE qui

ont une influence sur la voie de signalisation des androgènes, sur celle des hormones thyroïdiennes, ou qui interfèrent avec la synthèse des hormones stéroïdes. Ce test peut aussi détecter les perturbations de l'axe HPG qui vont empêcher le bon déroulement de la puberté. Les PE qui interagissent avec la voie de signalisation sont aussi susceptibles de se traduire par des anomalies détectées par ce test. Les rats femelles sont exposées à la substance d'essai à partir de leur 22^{ème} jour, alors qu'ils ne sont pas encore sexuellement matures, et ce pendant 21 jours environs. Cette durée est plus courte que pour le test équivalent chez le mâle car la femelle achève sa maturation sexuelle plus tôt que le mâle. Ces rats sont alors particulièrement sensibles aux modifications de concentrations d'œstrogènes. La maturité sexuelle est considérée atteinte lorsque l'ouverture vaginale, phénomène œstrogéno-dépendant, est observée. L'âge auquel elle survient est déterminant quant au résultat du test. L'âge où se produit le premier oestrus est également mesuré. Comme chez le mâle, à ces paramètres s'ajoutent la mesure du poids corporel au moment de l'observation de l'ouverture vaginale, et celui de différents organes (ovaires, utérus, thyroïde, hypophyse, glandes surrénales). Les ovaires, l'utérus et la thyroïde subissent un examen histopathologique, et les concentrations sériques des hormones thyroïdiennes et de la TSH sont mesurées.

Les bio-essais péripubertaires mâle et femelle présentés ci-dessus intègrent de nombreux modes d'actions toxiques potentiels et ne sont donc pas spécifiques aux PE. Leur grande force est le fait que les animaux ont des axes HPG et HPT intacts, ce qui facilite l'extrapolation chez l'homme des effets observés. La contrepartie est une moindre sensibilité en comparaison avec les tests Hershberger et utéro-trophique en ce qui concerne la détection des antagonistes et agonistes des récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes.

Les quatre tests ainsi exposés –Utéro-trophique, Hershberger, péripubertaires mâle et femelle- constituent la batterie de tests *in vivo* du premier niveau selon l'US-EPA de la perturbation de l'axe HPG chez le mammifère. L'OCDE confère également un rôle de criblage

à un autre test, les autres tests *in vivo* de niveau 4 étant de plus longue durée s'inscrivent plutôt dans le cadre de l'évaluation des risques.

- Toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours sur les rongeurs (TG 407). Ce bio-essai fournit des informations sur les dangers pour la santé qui peuvent résulter d'une exposition à une substance d'essai par voie orale. Il a néanmoins été conçu dans l'optique criblage et de l'évaluation de la perturbation de l'axe HPG, puis a été adapté pour le dépistage des perturbations de l'axe HPT. Chaque dose doit être testée chez les mâles et les femelles, idéalement chez le rat. Les paramètres étudiés sont les mêmes que ceux des tests réalisés sur rats péripubertaires mâles et femelles. Complémentaire à ces derniers tests, ce test de 28 jours permet de connaître la toxicité de la substance d'essai sur des animaux adultes. Les résultats permettent une prise de décision en amont des études menées à plus long terme.

3. Conclusion

La perturbation des hormones sexuelles et de leur signalisation fait l'objet de tests précoces *in vitro* et de tests *in vivo* spécifiquement prévus pour son criblage. L'utilisation conjointe de tous ces tests permet ainsi de couvrir les perturbations de la synthèse hormonale comme la perturbation des voies de signalisation modulées par les hormones sexuelles. Les tests *in vitro* ont le double avantage de fournir des alertes à très court terme et d'orienter sur le mécanisme infra individuel mis en jeu dans les manifestations de la toxicité alors identifiée. Les tests *in vivo* permettent à la fois de confirmer les alertes émises à l'issue des tests *in vitro*, de les compléter grâce à une sensibilité et une spécificité supérieures, et de disposer d'indications mécanistiques plus pertinentes, intégrant en effet la complexité liée à la dimension de l'organisme entier. Ils sont en revanche bien plus longs à mettre en œuvre et exigeants en termes de coûts et d'installations à mobiliser. Une approche comparable est préconisée pour le criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne (OECD, 2012b). A ce jour, celle-ci est essentiellement criblée par des tests *in*

vivo de criblage de la perturbation des hormones sexuelles, auxquels ont été greffés certains paramètres (voir paragraphes précédent et suivant).

B. Tests de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne

Parmi les éléments qui concernent la fonction thyroïdienne dans le cadre conceptuel de l'OCDE pour le criblage de la perturbation endocrinienne (Fig.IV-11), en dehors du test de transactivation qui ne cible que l'action directe sur les TR, tous les tests sont de niveau 3 et nécessitent une période d'exposition des animaux d'environ un mois.

Parmi ces tests *in vivo* de niveau 3, seul le test de métamorphose sur les amphibiens est spécifiquement orienté sur le dépistage de la perturbation de la fonction thyroïdienne. Ce test reste assez lourd en termes de moyens à mettre en œuvre puisqu'il dure 21 jours pour la phase d'exposition des animaux à la substance d'essai, nécessite des installations spécifiques, et parce que les critères de positivité et morphométrie doivent être évalués pour chaque animal par un opérateur qualifié. Dans les autres cas présentés, les effets du produit sur la thyroïde ou les hormones thyroïdiennes sont évalués au moyen de l'examen post mortem des thyroïdes ou de dosages hormonaux, qui ont été ajoutés à des tests préexistants généralistes ou orientés sur les hormones sexuelles. Ainsi, les tests décrits par les guidelines n'entrent en jeu qu'après que l'effet du produit sur les hormones sexuelles n'ait été évalué *in vitro*.

Les premières études *in vivo* réalisées chez le rongeur sont l'occasion d'inclure des prélèvements de thyroïde et/ou d'hypophyse selon les cas, et de contrôler les concentrations circulantes de T₃, T₄, et TSH. Notamment, les essais utéro-trophique et Hershberger présentés dans la partie précédente sont généralement la première étape d'évaluation de la perturbation de la fonction thyroïdienne. Lorsqu'un doute existe à propos de l'effet d'une molécule, des études spécifiquement dédiées à la toxicité thyroïdienne sont menées. Les alertes sont donc relativement tardives et sont données à l'issue d'études *in vivo* relativement longues et coûteuses. Un manque existe en ce qui concerne la mise en place de tests *in vitro* ou *in vivo* plus rapides, qui pourraient détecter plus précocement des effets thyroïdiens.

En dehors des recommandations et des schémas de tests bien caractérisés, de nombreux tests sont disponibles pour tester différents aspects de la perturbation de la fonction thyroïdienne. La présente section propose de présenter une série de tests pertinents inclus dans une batterie de tests réalisables en routine dans le cadre du développement des produits chimiques ou des produits phytosanitaires. Un tableau figurant en page annexe reprend l'essentiel des informations présentées dans cette partie, concernant les tests *in vitro* sélectionnés. Afin de compléter cet aperçu de l'existant en termes de tests *in vitro* de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, quelques autres tests plutôt orientés vers l'écotoxicologie seront également décrits.

1. Évaluation de l'intégrité de la signalisation centrale

On entend ici par signalisation centrale l'hypothalamus, l'hypophyse, et les signaux entrant ou sortant de ces organes qui contribuent à l'homéostasie des hormones thyroïdiennes.

a. Évaluation par les tests *in vivo*

Aucun test sur mammifère n'est conduit spécifiquement pour dépister la perturbation de la fonction thyroïdienne en première intention. Ce sont les tests de criblage de la perturbation des voies de signalisation des hormones sexuelles détaillés dans la partie précédente, auxquels sont ajoutés des paramètres qui permettent le criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, qui constituent l'ensemble des tests *in vivo* pour ce type d'évaluation. Sur ces tests menés sur le rat, l'hypophyse peut-être facilement prélevée et subir une analyse histologique et/ou de biologie moléculaire. Le dosage de la TSH circulante est en outre un paramètre mesuré en routine dans les tests *in vivo* dans lesquels la perturbation de la fonction thyroïdienne est évaluée. Cependant, la variation d'aucun de ces paramètres n'est spécifique à une action initiale de la substance d'essai sur la signalisation centrale de l'axe HPT. Il est ainsi difficile de différencier une action centrale d'une action se produisant spécifiquement sur le reste de l'axe HPT. En effet, les conséquences peuvent se répercuter au niveau central en raison de la mise en œuvre des mécanismes de rétrocontrôle de la sécrétion des hormones.

En raison de la difficulté d'isoler le noyau paraventriculaire, il n'est pas usuel de réaliser d'analyse sur l'hypothalamus.

b. Évaluation par les tests in vitro

i. Essai de production / libération de TRH

Aucun test *in vitro* mesurant la production ou la libération de TRH par des cellules en culture n'a à ce jour été mis au point. Cependant, la régulation négative de la transcription de TRH par la T₃, spécifique aux neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Koller et al., 1987), a pu être reproduite dans quatre modèles cellulaires que sont la lignée de cellules rénales de singe CV-1 (Ohba et al., 2011), la lignée de cellules placentaires humaines JEG-3 (Flynn et al., 1994) transfectées avec le récepteur TR β , et les cultures primaires de neurones hypothalamiques de poussin (Lezoualc'h et al., 1992) et de rat (Carreón-Rodríguez et al., 2009).

ii. Essai d'activation du récepteur à la TRH

La lignée cellulaire issue d'une tumeur hypophysaire de rat, GH3, a pour particularité une production d'hormone de croissance et de prolactine régulée par la stimulation du récepteur à la TRH (Mijiddorj et al., 2011). Un test pourrait ainsi évaluer la capacité de substances d'intérêt à activer ce récepteur par la mesure de TRH ou de prolactine émis dans le milieu de culture. Un test disponible dans le commerce mesure la stimulation du récepteur à la TRH humain dans les cellules Chem-1 par les variations de flux de calcium engendrées par l'exposition à la substance d'essai (Milipore HTS126C ; ChemiScreen™ Human Recombinant TRH Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Calcium-Optimized Stable Cell Line).

iii. Essai d'activation du récepteur à la TSH

La lignée cellulaire ovarienne de hamster chinois CHO transfectée avec le récepteur à la TSH est le modèle privilégié pour l'étude de l'activation du récepteur TSH-R par les xénobiotiques (De Gregorio et al., 2011; Santini et al., 2003). La production d'AMPc, régulée par la TSH, est alors le paramètre quantitatif mesuré.

2. Mise en évidence de la perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes

a. Essais in vivo

Les concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes sont maintenant systématiquement mesurées, et les thyroïdes prélevées pour analyse histologique au moment du sacrifice dans les études *in vivo* sur rat déjà citées. L'effet des substances d'essai sur la synthèse hormonale à proprement parler n'est ainsi pas précisément mesuré. En effet, les concentrations circulantes sont la résultante de la synthèse, de la distribution, du métabolisme, et de l'élimination des hormones. Les atteintes histologiques, telles la réduction de la lumière des follicules thyroïdiens, donnent de bonnes indications quant à la vraisemblance d'une synthèse hormonale altérée ; elles permettent de se prononcer sur l'existence d'une altération morphologique de la thyroïde mais n'atteste pas d'une perte de sa fonctionnalité.

b. Essais in vitro

i. Essais d'évaluation de la fonction de la thyroperoxydase (TPO)

L'influence des xénobiotiques sur la fonction de la TPO est classiquement évaluée *in vitro* à l'aide de l'essai d'oxydation du guaiacol (Paul et al., 2013; C Schmutzler et al., 2007). Ce test est relativement bien connu et donne des résultats qui dépendent peu de l'espèce – le plus souvent le porc mais également le rat- dont est issue la TPO utilisée (Paul et al., 2013). Le test d'oxydation du guaiacol utilise soit de la TPO isolée à partir d'échantillons de thyroïdes, soit la TPO de microsomes de thyroïde. La coloration du guaiacol durant la réaction d'oxydation est mesurée par spectrophotométrie, et le suivi du produit cinétique formé permet de quantifier une éventuelle inhibition de l'activité de la TPO.

Récemment développé, le test AUR-TPO (Amplex UltraRed TPO Inhibition Assay) utilise la technologie Amplex UltraRed, disponible dans le commerce, qui est vendue pour la mesure de la production de peroxyde d'hydrogène par les tissus ou les cultures de cellules (Katie B Paul et al., 2014a). Pour ce test, des microsomes de thyroïde sont mis en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène et du substrat (Amplex UltraRed), et l'activité peroxydase de la TPO est mesurée par la perte de fluorescence du substrat une fois oxydé.

En comparaison avec le test d'oxydation du guaiacol, ce test requiert une quantité bien moindre de microsomes, il est adaptable pour une utilisation à plus haut débit, et serait plus sensible (Katie B. Paul et al., 2014).

Si ces deux tests sont fonctionnels pour identifier les composés toxiques pour la TPO, cible de nombreux PE connus, il est à noter qu'aucun test n'intègre le fonctionnement intrinsèque de la TPO et son interaction avec la dual oxidase 2 (DUOX 2), qui est son partenaire catalytique, colocalisée sur la membrane apicale des thyrocytes.

ii. *Essais d'évaluation de l'activation du symporteur sodium / iode (NIS)*

L'activité du symporteur NIS est classiquement mesurée par l'augmentation de la radioactivité des cellules mises en présence d'iode radio- (^{125}I). De nombreuses expérimentations de ce type ont été réalisées sur cellules FRTL-5, une lignée de cellules folliculaires de thyroïde de rat qui exprime le NIS (Cornelia Schmutzler et al., 2007). La mesure de l'incorporation d'iode radiomarquée est également documentée pour la lignée humaine de cellules rénales embryonnaires HEK293 (Lecat-guillet et al., 2008).

Un test sur cellules FRTL-5, qui ne fait pas intervenir de radioactivité, a également été mis au point pour mesurer l'action des xénobiotiques sur l'activité du NIS. Ce test utilise la réaction de Sandell et Kolthoff qui est accélérée en présence d'iodure. Le Ce^{4+} , jaune, est réduit en Ce^{3+} incolore par l' As^{3+} . La perte de coloration est proportionnelle à la concentration d'iodure, et peut être mesurée par spectrophotométrie à 420 nm (Waltz et al., 2010). L'inconvénient de cette méthode avec celle faisant intervenir la radioactivité est l'interférence possible avec les résultats du test de phénomènes redox induits par les substances d'essai.

3. Détection de la perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes

a. *Essais in vivo*

Les tests *in vivo* réalisés en première intention sont menés sur rongeurs ou sur amphibiens. Ni les uns ni les autres n'expriment la thyroxine binding globulin (TBG) qui est le

principal transporteur des hormones thyroïdiennes chez l'homme (OECD, 2006a). En outre, la fraction libre des hormones thyroïdienne est très faible et n'est pas mesurée en routine, au profit des hormones totales. Il est ainsi peu probable d'identifier une perturbation initiée par le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs transporteurs sanguins lors du criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne. En revanche, même si cela n'a pas été évalué, le déplacement des hormones de la transthyrétine (TTR), qui a pour conséquence une diminution du transport trans-placentaire et à travers la barrière hémato-encéphalique, pourrait éventuellement être détecté par ces tests *in vitro* précoces du fait des conséquences du manque d'hormones thyroïdiennes au niveau du cerveau (Murk et al., 2013).

Le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs transporteurs sanguins est donc difficile à détecter par les tests *in vivo* court terme, et il apparaît incontournable de tester au moyen de tests *in vitro* la capacité des substances d'essai à induire ce mécanisme.

b. Essais in vitro

Les tests *in vitro* susceptibles de dépister la perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes ont tous pour principe d'étudier la capacité des substances d'essai à rentrer en compétition avec les hormones pour la liaison sur les protéines de transport. Ces tests sont bien caractérisés et sont applicables en routine sans plus de développement. Aucun test n'évalue une éventuelle capacité des substances à perturber le transport trans-placentaire ou à travers la barrière hémato-encéphalique des hormones par un autre mécanisme que la perturbation de leur liaison au TTR.

i. Déplacement d'un isotope non radioactif de la T₄ des transporteurs mesuré par LC-MS

Ce test mesure l'inhibition non compétitive de la fixation d'un isotope stable de la T₄ ((13)C(16)-L-Thyroxine) sur la TBG et/ou la TTR. L'inhibition est visualisée par la diminution du/des pic(s) spécifique(s) du/des complexe (13)C(16)-L-Thyroxine/TBG et/ou (13)C(16)-L-Thyroxine/TTR en chromatographie liquide – spectrométrie de masse (LC-MS) (Aqai et al., 2012). L'inconvénient de ce test est son coût de mise en œuvre.

ii. *Déplacement d'un marqueur fluorescent (ANSA) des transporteurs mesuré par spectrofluorométrie*

Ce test à l'état de recherche mesure le déplacement du sel d'ammonium de l'acide 8-anilino naphthalène sulfonique (ANSA), fluorescent, qui se fixe sur la TBG et la TTR à la place de T₃ et T₄ (Cao et al., 2010).

iii. *Puce Biacore recouverte de T₄*

Ce test en cours de développement mesure de façon automatisée, par une unité arbitraire, l'occurrence de l'inhibition de fixation de TTR recombinante ou TBG à la T₄ fixée à la puce (Marchesini et al., 2006).

iv. *Déplacement de T₄ radiomarquée de la TTR*

Ce test à l'avantage de mesurer spécifiquement et de façon quantitative le déplacement de la T₄ de la TTR. La T₄ marquée (¹²⁵I-T₄) liée à la TTR est séparée de la T₄ marquée libre par une colonne Biogel P-6PG, et la mesure se fait à l'aide d'un compteur gamma (Weiss et al., 2009).

4. Métabolisme et excrétion

Les hormones thyroïdiennes subissent trois types de métabolisation périphériques. Elles peuvent être déiodinées dans les organes cibles pour engendrer des formes actives ou inactives, sulfonylées ou plutôt glucuronylées au niveau du foie pour faciliter leur excrétion.

a. *Essais in vivo*

L'induction des enzymes hépatiques, UGT (UDP-glucuronosyltransférases) et SULT (sulfotransférases) est souvent accompagnée d'une augmentation de la masse du foie, qui est un paramètre évalué dans les études *in vivo* de court terme. Chez le rat, la taille de cet organe est suffisante pour autoriser, en plus des prélèvements réalisés en vue de l'étude histologique, l'étude par qPCR des inductions ou répressions de la transcription des gènes qui codent pour les UGT et les SULT. Ainsi, si cette analyse n'est pas faite en routine, elle peut être facilement ajoutée aux protocoles standards, afin de s'affranchir du moindre doute concernant toute modification du métabolisme des hormones thyroïdiennes.

La déiodation est un paramètre plus difficile à étudier dans ces études car elle a lieu au niveau périphérique, selon une localisation qui va dépendre du composé étudié, *a priori* inconnu.

b. Essais in vitro

i. Etude de la déiodation

Les tests disponibles qui permettent d'évaluer la capacité des substances à interagir avec les déiodinases sont basés sur la détection des métabolites. Cette détection peut faire intervenir la radioactivité, ce qui semble aujourd'hui être le meilleur compromis entre spécificité et coûts de mise en œuvre (OECD, 2014). Une alternative prometteuse à la radioactivité est la colorimétrie, cependant toujours limitée en termes de sensibilité. L'HPLC (high performance liquid chromatography) est une troisième méthode intéressante par sa sensibilité et à condition que tous les métabolites puissent être isolés.

La radioactivité est utilisée pour détecter une modification de l'activité déiodinase de différents modèles cellulaires ou préparation de microsomes. Après incubation en présence d'iodure de T₄ radiomarquée et de co-substrats nécessaires, la libération d'iode radioactif dans le milieu est mesurée. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la déiodinase 1, par exemple le PTU, permet comparativement d'isoler l'effet de la déiodinase 1 de celui des déiodinases 2 et 3 (Cornelia Schmutzler et al., 2007).

Les méthodes colorimétriques utilisent la réaction de Sandell et Kolhoff décrite précédemment, qui est accélérée par l'iode. Ainsi, l'iode libéré lors des réactions de déiodinations, qui ont lieu dans des fractions microsomales de foies de souris, provoque une décoloration proportionnelle du milieu qui peut être mesurée par spectrophotométrie (Renko et al., 2012).

Enfin, une méthode basée sur la quantification de T₃ et rT₃ par HPLC couplée à la spectrographie de masse évalue la capacité des substances d'essais à perturber l'activité de la déiodinase I dans des microsomes hépatiques (Butt et al., 2011). Seule est documentée à ce jour l'utilisation de microsomes d'origine humaine, et des recherches complémentaires sont nécessaires pour évaluer la transférabilité de la méthode à d'autres espèces.

ii. *Etude de la glucuronidation*

Un récent rapport de l'OCDE (OECD, 2014), qui recense différents tests *in vitro* et *ex vivo* susceptibles d'être utilisés pour le criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, recense deux types de tests à réaliser sur microsomes hépatiques pour détecter la capacité des substances à augmenter l'activité UDP-GT hépatique. Dans les deux cas, il s'agit de détecter la présence de métabolites glucuronylés après une période d'incubation d'un substrat en présence de microsomes hépatiques. Les méthodes colorimétriques mesurent par spectrophotométrie la transformation d'un substrat coloré (4-nitrophénol, bilirubine, etc) (King et al., 2000), et les méthodes qui utilisent la LC-MS mesurent la glucuronidation de T₃ et/ou de T₄ (Tong et al., 2007). L'exploitation de ces méthodes dans une optique de criblage apparaît cependant compliquée. En effet, la plupart des xénobiotiques qui induisent l'activité UDP-GT hépatique, provoquent chez les rongeurs une augmentation de l'élimination biliaire des hormones thyroïdiennes et secondairement une augmentation de la concentration de TSH circulante. Ces xénobiotiques agissent ainsi *via* l'activation de récepteurs nucléaires à l'origine d'une augmentation de l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les UDP-GT (D B Buckley and Klaassen, 2009; David B Buckley and Klaassen, 2009; Qatanani et al., 2005).

Une autre approche consiste à incuber des cellules primaires hépatiques cryopréservées en présence d'une substance d'essai, et d'évaluer l'induction de la transcription des gènes codant pour les UDP-GT par RT-qPCR (Al Khansa et al., 2010; Fournel-Gigleux et al., 2010). Ce type de tests est prometteur mais nécessite des recherches complémentaires afin de confirmer la fiabilité des résultats obtenus et de standardiser les procédures à appliquer.

iii. *Etude de la sulfonation*

La capacité à inhiber l'activité des SULT hépatique est possible à évaluer *in vitro* au moyen de d'hépatocytes ou de cellules transfectées avec des sulfotransférases incubées en présence de soufre marqué (³⁵S) servant à la quantification de la sulfonylation (Schoor et al., 1998). Des recherches semblent cependant nécessaires pour confirmer la pertinence

biologique de ce mode d'action et, le cas échéant, la pertinence d'un tel test *in vitro* dans une optique de criblage.

5. Transport transmembranaire des hormones thyroïdiennes

Au niveau des cellules cibles des hormones thyroïdiennes, ces dernières sont incorporées de façon active par des transporteurs dont l'expression varie dans le temps et selon le type cellulaire. Plusieurs transporteurs sont connus, dont les Monocarboxylase Transporter 8 (MCT8) et 10 (MCT10), et les Organic Anion Transporter Protein 1C1 (OATP1C1) et 3A1 (OATP3A1).

a. Essais in vivo

Les différents tests de criblage *in vivo* intègrent la totalité des modes de perturbation, dont celle du transport transmembranaire des hormones thyroïdiennes. Cependant, il est difficile d'identifier *in vivo* un mécanisme de toxicité initié au niveau des transporteurs transmembranaires des hormones thyroïdiennes.

b. Essais in vitro

Des tests *in vitro* sont bien connus et optimisés pour l'étude de divers transporteurs transmembranaires, et peuvent être rapidement adaptés au criblage de la perturbation du transport des hormones thyroïdiennes moyennant l'utilisation d'hormones radiomarquées. L'intégration de tels tests au sein d'une batterie n'est pas jugée pertinente dans le cadre de criblage. En effet, l'activité d'une substance d'essai sur le transport transmembranaire serait *a priori* détectée dans les tests cellulaires de transactivation transcriptionnelle des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. Un test spécifique à l'évaluation de l'effet d'une substance sur les transporteurs est envisagé en seconde intention. Il s'agit dans ce cas de déterminer le mécanisme d'action à l'origine de l'alerte émise à l'issue du test de transactivation transcriptionnelle du TR.

Les tests décrits pour l'évaluation de l'effet de substances d'essais sur la concentration intracellulaire des hormones thyroïdiennes utilisent tous des hormones incluant de l'iode radiomarké. Différentes cultures primaires et les lignées HEPG2 (cellules

humaines hépatomateuses), GH3-L (cellules hypophysaires de rat), et SHSY5Y (cellules neuroblastomateuses), ont été utilisées (OECD, 2014). L'étude indépendante de l'effet d'une substance d'essai sur un transporteur particulier est également possible sur des modèles cellulaires transfectés avec l'un d'entre eux. L'incorporation de ^{125}I -T₄ dans des cellules HEK293 (cellules embryonnaires rénales humaines) transfectées avec le récepteur OATP1C1 a ainsi permis de modéliser l'effet de médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens sur le passage des hormones thyroïdiennes à travers la barrière hémato-encéphalique (Westholm et al., 2009). De la même façon, l'incorporation de ^{125}I -T₃ dans des cellules COS1 (Ane) ou MDCK-1 (chien) transfectées avec le transporteur MCT10 ou MCT10 ont permis d'étudier l'activité de chaque transporteur séparément (Braun et al., 2013; Capri et al., 2013).

6. Effet des hormones thyroïdiennes médié par le récepteur TR

Longtemps considérée comme marginale et peu pertinente dans le cadre de l'identification des dangers représentés par les produits chimiques, la perturbation de la signalisation dépendante du récepteur aux hormones thyroïdiennes est aujourd'hui connue pour être provoquée par des composés comme les (polychlorinated biphenyls) PCBs ou les dérivés du BPA. Ce mécanisme doit par conséquent être intégré à la démarche de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne.

a. Essais *in vivo*

Par essence, les tests *in vivo* intègrent les différents mécanismes de perturbation existants, et les tests de criblage décrits précédemment sont indiqués pour la détection des composés qui modifient la signalisation intracellulaire des hormones thyroïdiennes. Ces tests ne sont pas pour autant adaptés pour identifier la mise en jeu de ce mécanisme de toxicité.

b. Essais *in vitro*

Trois types de tests *in vitro* peuvent être utilisés pour le criblage de la perturbation de la signalisation intracellulaire des hormones thyroïdiennes médiée par le récepteur TR. Certains étudient la liaison des hormones à leur récepteur, d'autres étudient l'activité fonctionnelle des promoteurs qui dépendent du complexe hormone-récepteur, et les

derniers se focalisent sur les interactions entre les récepteurs et leurs co-répresseurs ou co-régulateurs, ou tout autre protéine qui module leur activité.

iv. *Tests de liaison hormone / récepteur*

Ces tests évaluent la capacité des substances d'essai à modifier les propriétés de liaison des hormones thyroïdiennes au domaine de liaison du ligand situé sur le récepteur TR. Une limitation quant à l'interprétation des résultats est le fait que certains composés susceptibles d'agir sur le domaine de fixation du ligand peuvent être incapables, dans un modèle ou un autre, de pénétrer dans la poche de fixation du récepteur qui peut être différente selon le modèle étudié ou l'espèce d'intérêt.

Test d'inhibition compétitive de la liaison au TR dans les cellules MtT/E-2

Des cellules MtT/E-2 (cellules hypophysaires de rat) sont incubées en présence de $^{125}\text{I-T}_3$ et montrent ainsi au début de l'essai un niveau de radioactivité arbitrairement considéré à 100%. La radioactivité, mesurée à chaque addition de la substance d'essai, décroît proportionnellement avec le degré d'inhibition de la liaison $^{125}\text{I-T}_3$ / TR (Kitamura et al., 2005). La viabilité des cellules est vérifiée en temps réel grâce à l'expression constitutive de la protéine GFP (green fluorescent protein) par ces cellules (une baisse de fluorescence est synonyme de mort cellulaire). Le principal inconvénient de ce test, outre l'utilisation de radioactivité, est l'impossibilité de différencier une atteinte du TR α 1 d'une atteinte du TR β 1.

Test d'activité de TR α / β à l'aide de la transfection transitoire de cellules humaines

Des cellules humaines HeLa sont transfectées avec un construit d'un domaine de liaison du récepteur (Ligand Binding Domain, LBD) TR d'une espèce avec la luciférase, dont l'activité permet la quantification de la liaison de l'hormone au LBD. La méthode a été testée pour le TR α (Fini et al., 2012) et le TR β (Sun et al., 2008). En plus de la limitation déjà évoquée concernant la stricte utilisation du LBD, la transfection transitoire est source de variabilité inter-essais.

Test bactérien de détection des ligands des récepteurs TR α et TR β

Des bactéries *Escherichia coli* sont transformées avec un gène de fusion entre le LBD du récepteur TR (α ou β) et la thymidilate synthase. La liaison d'un agoniste au LBD active la thymidilate synthase et induit ainsi la croissance bactérienne, mesurée par l'absorbance optique à 600 nm (Gierach et al., 2012). La construction génétique dérive d'une méthode mise au point pour le récepteur ER. Ce test est compatible avec une utilisation à haut débit mais présente l'inconvénient d'utiliser un LBD isolé.

Test acellulaire de dissociation des hormones de leur récepteur

Les récepteurs sont d'abord liés à de la T₃ radiomarquée. L'introduction d'un ligand dans le milieu provoque la dissociation de l'hormone, ce qui peut être mesuré grâce à la radioactivité des hormones libérées (Cunha Lima et al., 2009). Outre l'utilisation de radioactivité, ce test manque de sensibilité.

v. *Test de transactivation transcriptionnelle pour l'identification des agonistes ou antagonistes des récepteurs des hormones thyroïdiennes*

Une lignée cellulaire de mammifère dont l'expression endogène des TR est très faible est transfectée avec un récepteur TR α ou TR β cloné dans un vecteur d'expression contenant un promoteur fort constitutivement actif. Un gène rapporteur, en général la luciférase, dont le promoteur est activé par le TR, est co-transfecté pour fournir une évaluation quantitative de la transactivation. Des plasmides contenant *Renilla luciferase* ou β -galactosidase sont également co-transfectés pour permettre la normalisation entre les réplicats et entre les essais. L'activité agoniste entraîne une augmentation de l'activité luciférase, et l'activité antagoniste peut être évaluée par une diminution de l'activité luciférase en présence de T₃.

Une grande limitation de ces tests est l'absence de métabolisation qui conduit à tester la forme native des molécules, qui n'est pas forcément la forme active ni la forme majoritaire dans l'organisme en cas d'exposition environnementale. Par exemple l'exposition aux phtalates, dont certains montrent des propriétés antagonistes au TR dans les essais de transactivation, se fait majoritairement par voie orale. Ils sont alors convertis en mono-esters, forme sous laquelle ils sont absorbés. Ainsi les résultats obtenus dans les tests *in vitro*

avec les phtalates n'ont probablement que peu de pertinence quant à leurs effets *in vivo* (OECD, 2012a). Cependant, ces tests ont une bonne sensibilité et spécificité, et sont compatibles avec une utilisation à haut débit.

vi. *Test de liaison des corépresseurs et coactivateurs de TR α/β dans un système acellulaire*

Les corépresseurs NCoR se lient aux TR non liés aux hormones thyroïdiennes, alors que les coactivateurs stéroïdes SRC2 se lient aux TR liés à la T₃. Leur liaison stabilise le TR dans son état de liaison à la T₃. Les tests de ce type utilisent une protéine de fusion entre le domaine LBD recombinant et la glutathion S-transferase, et les protéines NCoR et SRC2 greffées avec un fluorophore. La liaison entre les deux protéines est quantifiée par spectrofluorimétrie (Lévy-Bimbot et al., 2012). Cet essai compatible avec l'utilisation à haut débit présente l'inconvénient d'utiliser un LBD isolé.

7. Tests intégrant des modes d'actions multiples

a. *Essais in vivo*

Chacun des tests *in vivo* lors desquels sont étudiés des paramètres relatifs à la fonction thyroïdienne présentent l'avantage d'intégrer la réponse de tous les organes, et donc potentiellement tous les modes d'actions à l'origine de la perturbation de la fonction thyroïdienne. Si les tests sur rongeur présenté précédemment sont utiles à son étude, le test de métamorphose des amphibiens a été spécifiquement mis au point pour détecter les toxiques vis-à-vis de l'axe HPT. Ce test est intégré à la batterie de tests préconisée par l'OCDE dans son cadre conceptuel pour la détection des PE.

i. *Test de métamorphose des amphibiens (OECD TG 231).*

Ce test, bien que réalisé sur amphibien et donc sur une espèce n'appartenant pas à la classe des mammifères, est considéré comme pertinent pour tous les vertébrés en raison de la grande conservation au cours de l'évolution des structures concernées. Il couvre tous les mécanismes de perturbation de la fonction thyroïdienne, puisque la métamorphose, tout comme les changements histologiques, sont des événements apicaux. En théorie, donc, même les agonistes et antagonistes des TR peuvent être détectés par le test de

métamorphose des amphibiens puisqu'ils doivent avancer ou reculer l'âge de la métamorphose. En pratique, l'interprétation des résultats de ce test est variable selon l'examineur. Il existe un débat d'expert qui ne parvient pas à déterminer de critère de décision universel pour décider si la substance d'essai est un THDC ou non. Pour certains, il suffit qu'un des paramètres étudiés soit altéré alors que pour d'autres, il faut obligatoirement observer une anomalie histologique dans la thyroïde pour confirmer la perturbation (Zoeller et al., 2007). L'interprétation des résultats demeure encore compliquée du fait de la sensibilité du test aux inducteurs des UDP-GT. Par exemple le phénobarbital, qui n'est pas un THDC pour l'homme, l'est pour les rongeurs en raison de l'induction des UDP-GT. Cette substance donne alors un résultat positif dans le test de métamorphose des amphibiens, alors même qu'il est connu que les hormones thyroïdiennes ne sont pas conjuguées par ces enzymes chez les amphibiens (Pickford, 2010).

Le test de métamorphose des amphibiens peut donc difficilement être utilisé seul. Il est au contraire utilisé généralement après la conduite de tests *in vivo* sur rongeur (male and female pubertal assays, IMRSA, enhanced repeated dose oral toxicity), lorsque ceux-ci n'ont pas fourni d'informations concluantes sur la perturbation de la fonction thyroïdienne. Il peut également être utilisé en première intention, à condition de vérifier les hypothèses soulevées au moyens de tests *in vitro* mécanistiques.

ii. *Essai sur eleuthero-embryons de poisson zèbre (Zebrafish Eleutheroembryo Thyroid Assay)*

Après 3 jours d'exposition à la substance d'essai diluée dans l'eau, des eleuthero-embryons de poissons zèbres sont fixés et hybridés à des anticorps polyclonaux anti-T₄. Les anticorps fixés sont ensuite révélés par des anticorps secondaires fluorescents, et une image est capturée. La fluorescence est observable sans autre préparation grâce à la transparence des poissons. La concentration intrafolliculaire de T₄ au moment de la fixation peut ensuite être mesurée par une analyse d'image automatisée (Raldúa and Babin, 2009; Raldúa et al., 2012).

Comme pour le test de métamorphose des amphibiens, la conservation au cours de l'évolution des divers processus qui influent sur la concentration intrafolliculaire en T₄

permet d'extrapoler les résultats obtenus aux mammifères, dont l'homme. Cette extrapolation souffre des mêmes limites que dans le cas des tests sur amphibiens. En outre, ce test comporte une étape de choix de l'image capturée qui dépend de l'opérateur et ajoute beaucoup de subjectivité aux résultats. Il est également coûteux en termes de main d'œuvre et nécessite de disposer d'installations propres à accueillir l'élevage de poissons.

b. Essais ex vivo

Essai sur explants de glande thyroïde de têtards de xénopes

Des glandes thyroïde sont extraites de larves de *Xenopus laevis* et placées dans des plaques 96 puits dans un milieu de culture contenant de la TSH pour stimuler la synthèse de T₄. La T₄ totale est mesurée par RIA (Radio Immuno Assay) (Hornung et al., 2010). Ce test intègre les différents modes d'actions qui aboutissent à une perturbation de la synthèse de T₄ initiée au niveau de la thyroïde. Le test nécessite 8 jours de culture pour que la T₄ soit produite en quantité suffisante pour masquer les différences initiales de quantité de T₄ contenue dans les différentes glandes. Il est donc relativement lourd à mettre en place et ne se positionne pas comme du haut débit malgré la culture en plaques 96 puits. Une autre limitation concerne la détection de l'inhibition de la synthèse qui peut être rendue difficile par l'impossibilité de la différencier des conséquences d'une souffrance ou d'un stress général des glandes en culture en présence de la substance d'essai. Ce type d'essai est encore à l'état de recherche et nécessite un travail de développement avant d'imaginer sa mise en œuvre systématique.

c. Essais in vitro

T-Screen – Essai de prolifération induite par le récepteur TR activé

Le test « T-Screen » est basé sur l'induction de la prolifération cellulaire par le récepteur TR activé dans une lignée cellulaire tumorale d'hypophyse de rat, la lignée GH3, *a priori* compétente pour le transport transcellulaire ou la métabolisation intracellulaire des hormones thyroïdiennes. Ces cellules expriment le TR en grande quantité. Ce récepteur a une forte affinité pour la T₃, qui l'active par sa liaison. Dans le noyau, la fixation du récepteur sur les TRE (thyroid hormone responsive elements) entraîne l'expression de nombreux gènes et parmi eux, certains sont responsables de la prolifération cellulaire (You et al., 2006). Une

augmentation ou une diminution de prolifération en comparaison avec les cellules contrôle permet ainsi d'identifier les agonistes ou les antagonistes du TR respectivement. Les composés qui agissent sur la prolifération cellulaire de façon indépendante du TR ne peuvent pas être identifiés en tant que tels et constituent des faux positifs.

8. Conclusion

Des tests sont disponibles pour tester la plupart des mécanismes à l'origine d'une perturbation de la fonction thyroïdienne. Il n'existe en revanche pas de test court terme qui intègre un nombre important de ces mécanismes, et l'approche *in vitro* actuellement préconisée est de réaliser un test spécifique pour chacun d'entre eux. L'approche *in vivo* à court terme conseillée implique quant à elle l'ajout de paramètres spécifiques à la thyroïde aux tests de criblage de la perturbation des hormones sexuelles, réalisés sur un mois, qui ont donc leur place dans des phases plus tardives du développement des molécules.

Ainsi, deux axes de recherches ont été sélectionnés pour tenter de disposer de moyens de réaliser un criblage précoce et pertinent de la perturbation de la fonction thyroïdienne :

- Evaluer la pertinence d'un criblage basé sur des études *in vivo* court terme chez le rat mâle et sur l'utilisation de mesures d'expression de gènes en complément des paramètres classiques utilisés en toxicologie.
- Identifier un modèle *in vitro* qui permette d'intégrer le criblage de plusieurs mécanismes d'action parmi ceux à prendre en compte afin de réduire la batterie de tests à réaliser.

ARTICLE 1

Article proposé pour publication à la revue « Toxicology Research »

V. Screening Thyroid Effects using standard and molecular tools in 7-day Adult Male Rat toxicity Studies

Authors

Constantin Dallot^{bc}, Olivier Blanck^{ab}, Caroline Hilmi^b, Helen Tinwell^b, Frédéric Schorsch^b, R.Bars^b, C.Risso-De Faverney^c

a. Corresponding author. olivier.blanck@bayer.com.

b. Bayer SAS, Bayer CropScience, 355 rue Dostoïevski, CS 90153, 06906 Sophia Antipolis, France. caroline.hilmi@bayer.com; helen.tinwell@bayer.com; frederic.schorsch@bayer.com; remi.bars@bayer.com

c. Faculté des Sciences, University of Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, BP 71, 06108 Nice Cedex 2, France. Christine.RISSO@unice.fr.

Keywords

Thyroid, Rat, Endocrine Disruption, Gene Expression, Screening, Tier I Battery.

Abbreviations

AMT: Aminotriazole, AMI: Amiodarone, ATZ: Atrazine, HPT: Hypothalamus-Pituitary-Thyroid, IAMRSA: Intact Adult Male Rat Screening Assay, IOF: Iofensulfon, IPR: Iprodione, LiCO₃: Lithium Carbonate, MEI: Microsomal Enzyme Inducer, MIE: Molecular initiating

20 event, MMI: Methimazole, NaClO₄: Sodium Perchlorate, NaI: Sodium Iodide, PTU:
21 Propylthiouracil, T₃: Triiodothyronine, T₄: Thyroxine, TH: Thyroid Hormone, TPO:
22 Thyroperoxydase, TSH: Thyrotropin or Thyroid Stimulating Hormone, TTR: Transthyretin,
23 NIS: Sodium/Iodine Symporter, UDP-GT: UDP-glucuronosyltransferases.

Abstract

Although thyroid toxicity of environmental chemicals is a growing concern, the identification of such toxicants in early screening studies remains challenging due to the multitude of assays to perform in order to assess all the different mechanisms of toxicity on the thyroid function. Therefore, we explored the use of traditional toxicity parameters supplemented by transcriptomics in a short term in vivo rat toxicity study as a possible way to screen for thyroid toxicants.

We exposed daily adult male Wistar rats orally for 7-days to known toxicants directly active on the thyroid gland (Propylthiouracil, Methimazole, and Amitrole (or aminotriazole) which inhibit the thyroperoxydase; Sodium Iodide, Iofensulfon Sodium, and Amiodarone which release large excess of iodine; Sodium Perchlorate which inhibits iodide intake; or Lithium Carbonate which acts mainly on transcellular transports). Standard parameters such as histological examination of thyroid gland, evaluation of follicular cell proliferation, measurement of circulating TSH, T4, and T3, and measurement of gland weights were not sufficient to detect effects induced by all the toxicants tested. However, compared to vehicle control groups, thyroid transcriptomic profiles of a selection of genes involved in the regulation of thyroid hormone synthesis were significantly changed in rats exposed to the thyroid toxicants but only slightly in rats exposed to compounds having no known effect on the HPT axis.

Here we indicate the possibility of discriminating thyroid toxicants from compounds that do not alter thyroid function, by using transcriptomic profiles in a 7-day adult male rat assay.

A. Introduction

Early screening tests are essential to identify critical toxic properties of candidate molecules for development as early as possible after the discovery of their biological interest. The results of the screening tests provide an alert for toxicity, leading to complementary investigations in order to provide relevant information on the toxicity profile

of substances and to exclude definitively those not suitable for development. These tests are ideally rapid, cheap and easy to perform on a routine basis.

Among all the toxic properties that have to be screened in the development of new chemicals, there is increasing concern about endocrine disrupting properties. If the focus was initially put on sex hormone disruptors, the growing need is to better identify chemicals that can exert adverse effects on the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis. Thyroid hormone disruption is complex and can be caused by many different mechanisms. The HPT axis can be targeted at various levels, including the Thyroid Hormone (TH) synthesis *via* different molecular initiating events (MIE, e.g. inhibition of the thyroperoxidase (TPO) or of the Sodium-Iodide symporter (NIS)) and its regulation by hypothalamic-pituitary hormones (e.g. Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), Thyroid-Stimulating Hormone (TSH)), the TH binding and transport in blood (e.g. transthyretin (TTR) and albumin), the transcriptional activity of TH receptors (TRs) and the expression of TH-regulated genes, the peripheral activating/inactivating metabolism of THs by iodothyronine deiodinases (T_4 conversion to T_3 enzymes), (Boas et al., 2006; Crofton, 2008, Capen, 1994). Moreover, microsomal enzyme inducers (MEIs) increase the hepatic pool of enzymes responsible for the conjugation of thyroid hormones with sulfonyl or glucuronosyl residues (Klaassen and Hood, 2001). The resultant increase of elimination causes a decrease in circulating thyroid hormones in rodents (Hood et al., 1999).

The OECD recently reviewed available *in vitro* or *ex vivo* screening assays for these different mechanisms (OECD, 2014). The criterion to evaluate the level of readiness of the test was the possibility of validation as an OECD standardized assay. Among the different mechanisms described above, the endpoints covered by tests ready to be validated in the short-term were blood transport of the thyroid hormones by TTR and transport of thyroid hormones through cellular membrane, whereas liver-mediated mechanisms are considered already covered. The following endpoints can be assessed by assays potentially eligible for validation in the long-term: activation of receptors of thyroid hormones, TSH and TRH, and perturbation of hormonal synthesis by inhibition of the TPO or of the NIS, peripheral

79 deiodination. Two types of assays integrating several modes of action were also proposed as
80 potentially eligible for validation in the long-term: Zebrafish Eleutheroembryo Thyroid Assay,
81 and thyroid gland explant cultures. These two assays use radioimmunoassay to measure the
82 thyroid hormones produced by the model, regardless of the MIE elicited by the molecule
83 studied. Both of them are only considered for low-throughput pre-screen assays.

84 If some of the endpoints of interest can already be assessed in *in vitro* or *ex vivo*
85 assays, this recent OECD report emphasized a significant lack of operational assays for
86 detection of all known types of thyroid toxicants.

87 In a previous report on screening and testing methods that were focused on
88 endocrine disruptors and not limited to *in vitro* and *ex vivo* assays, the OECD suggested the
89 use of fish and amphibian larvae and their metamorphosis as the *in vivo* models for short-
90 term specific investigation of the thyroid function (OECD, 2012a). These assays only consider
91 the final effect of thyroid hormone on the animals. This last approach is interesting because
92 the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid (HPT) axis is well conserved across taxa. However, the
93 report pointed out the difficulty to extrapolate conclusions across species. It seems unlikely
94 that non-mammalian vertebrate *in vivo* assays would fully replace mammalian assays for
95 assessing potential thyroid toxicity in humans. In addition, Pickford (2010) reported in his
96 peer-review the lack of evidence that an amphibian screening assay would detect significant
97 numbers of thyroid-active chemicals not picked up by currently routinely used mammalian
98 assays. Therefore, the use of amphibian metamorphosis assay for screening purposes
99 appears to be at least redundant with the currently used mammalian assays, when the
100 reduction of animal use in toxicity testing is a priority.

101 As mentioned in the last paragraph, thyroid-related endpoints can be “added-on” to
102 standard *in vivo* studies conducted to detect other toxic properties of chemicals. In
103 particular, thyroid-related endpoints are now routinely examined in male and female
104 pubertal assays and in the Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents (OECD TG
105 407) (OECD, 2006b; Zoeller and Tan, 2007). Furthermore, a 15-day *in vivo* assay such as the

15-day Intact Adult Male Rat Screening Assay (IAMRSA), designed to screen endocrine disruptors including thyroid toxicants has been proposed since many years. The studies designed to validate the relevance of the incorporation of the IAMRSA in screening batteries did not show clear superiority compared to simple add-ons on male and female pubertal assays. These four types of assays have difficulties in differentiating primary effects related to primary interactions with the endocrine system from secondary effects caused by systemic toxicity (Becker et al., 2012). This weakness implies a “weight-of-evidence approach” applied to help to confirm results from different tests and to determine whether the alert signal provided may be or not be relevant.

The purpose of the present study was to explore the toxicological relevance of an *in vivo* screening approach based on a short duration (7 days) *in vivo* rat assay, specifically designed to detect thyroid toxicants and integrating different MIE. The main criterion of relevance of this 7-day rat *in vivo* assay was the ability to discriminate chemicals inducing primary TH-disrupting effects from those having no effect on thyroid hormone signaling or only secondary effects related to their systemic toxicity, as it is the main weakness of pubertal assays, IAMRSA, and of the Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents (OECD TG 407). Therefore we tested eight known thyroid toxicants that affect the thyroid hormone synthesis, and two compounds having no reported potential for thyroid toxicity but which are potential sex hormone disruptors, Iprodione (IPR) and Atrazine (ATZ). Main mechanisms of action and toxic effects of each compound are summarized in table 1. The fact that ATZ has no effect on the HPT axis in treated male rats according to the pubertal protocol was published by Stoker et al (Stoker et al., 2002). ATZ and IPR were both extensively studied in numerous toxicity studies, at least during the processes of registration. No effect on the HPT axis was reported for these two compounds. Propylthiouracil (PTU), Methimazole (MMI), and Amitrole (or aminotriazole, AMT) inhibit the iodification of the thyroglobulin in the colloid by inhibiting the thyroperoxydase, an enzyme of the apical membrane of the thyroid follicular cell. Iodine in excess, administered as Sodium Iodide (NaI), or released from iofensulfon sodium (IOF) or Amiodarone (AMI) cause a transient inhibition of the TPO (Wolff and Chaikoff, 1948), and the proteolysis of the thyroid

135 hormones before their secretion (Capen, 1994). Sodium Perchlorate (NaClO_4) is an inhibitor
136 of the Sodium-Iodide Symporter (NIS) located at the basal membrane of the thyroid follicular
137 cell. It inhibits the hormonal synthesis by decreasing the concentration of iodide in the
138 colloid (Merrill et al., 2003; Yu et al., 2002). Lithium Carbonate (LiCO_3) inhibits the release of
139 thyroglobulin in the colloid (Radvila et al., 1976) and its endocytosis back into the thyroid
140 follicular cell (Radvila et al., 1976; Temple et al., 1972), causes the proteolysis of active
141 hormones before their secretion (Capen, 1994), and inhibits the enrichment in iodide of the
142 thyroid gland (Singh et al., 1994).

143

Table V-1. Mechanism of action and effects of thyroid toxicants on thyroid regulation and main toxicity documented regarding substances not being thyroid toxicants

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

Chemicals	Thyroid regulation target / known toxicity target	Effect on thyroid regulation / main toxic effect	References
Perchlorate (sodium perchlorate, NaClO₄-)	NIS-mediated iodide uptake	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Merrill et al., 2003; Yu et al., 2002)
Methimazole (MMI)	TPO inhibition	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Leoni et al., 2011; Katie B Paul et al., 2014a)
Amitrole (AMT)			
Propylthiurea (PTU)	Inhibition of deiodinase 1 activity	Decreased peripheral conversion of T ₄ into T ₃	(Ortega et al., 1996)
Amiodarone	THr α1 and β1 agonism	Decreased pituitary synthesis of TSH	(van Beeren et al., 2012)
	Inhibition of peripheral D2 activity	Decreased peripheral conversion of T ₄ into T ₃	(van Beeren et al., 2012)
	Release of free iodide in blood stream: transient TPO inhibition	Thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃ transiently decreased (Wolff-Chaikoff effect)	(Wolff, 1998)
	Inhibits TSH receptor signalling	Persistence of the Wolff-Chaikoff effect	(Pitsiavas et al., 1999)
Excess of Iodine (Sodium Iodide, NaI)	Release of free iodide in blood stream: transient TPO inhibition	Thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃ transiently decreased (Wolff-Chaikoff effect)	(Wolff and Chaikoff, 1948)
	Proteolysis of active hormone from the colloid	Decreased thyroid hormone secretion	(Capen, 1994)
Iofensulfon sodium	Mechanism unknown, suspected to release iodide in blood stream: see NaI	See NaI	No published data
Lithium (Lithium carbonate)	Inhibition of thyroglobulin release	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Radvila et al., 1976)
	Proteolysis of active hormone from the colloid	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Capen, 1994)
	Thyroglobulin endocytosis inhibition	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Radvila et al., 1976; Temple et al., 1972)
	Inhibition of iodide trapping by thyroid		(Singh et al., 1994)
Atrazine	No potential for thyroid disruption	No potential for thyroid disruption	(Stoker et al., 2002)
	Sex hormone disruptor: GnRH signaling	Decreased male and female gamete production	(Laws et al., 2000)
Iprodione	No potential for thyroid disruption	No potential for thyroid disruption	(Unpublished data, no entry for « thyroid + Iprodione » in Pubmed)
	Sex hormone disruptor	Cholesterol biosynthesis inhibited	(Blystone et al., 2007)

Different parameters were assessed to determine whether the compound under investigation would be considered as a probable thyroid toxicant. In particular, circulating levels of thyroid hormones; T3, T4, and TSH, were measured immediately prior to sacrifice of the animals. Thyroid gland and liver were collected for macroscopic and/or histological examination. These primary endpoints in the detection of thyroid disruption are tested in the different 14-days or more in vivo rat assays described above (Male and Female pubertal assays, IAMRSA). We also evaluated the level of proliferation of the thyroid follicular cells using KI67 marker revealed by immunohistochemistry (IHC) and the TSH gene expression in pituitary gland using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). In the present study, four different sets of genes were measured in thyroid tissue: the first set is involved in direct regulation of thyroid hormone synthesis, the second set in cell cycle regulation/ cell death / cell proliferation / tumor genesis or encoding for a tumor marker, the third set in cell signaling and finally the last set in thyroid transcription factors (Table 2). Changes in mRNA levels were measured using qRT-PCR. The relevance of these sets of gene transcripts as potential early biomarker of thyroid toxicity was assessed. Indeed, several in vitro and in vivo studies showed changes in transcript levels of many genes in rat thyroid follicular cells after administration of thyroid toxicants (Gentilcore et al., 2013; Giuliani et al., 2014; Glatt et al., 2005; Hard, 1998; Leoni et al., 2011, 2008; Mcdougal et al., 2011). To our knowledge, no data are available on changes in gene expression in the rat thyroid gland after a short duration in vivo exposure, for screening and testing chemicals (Glatt et al., 2005; Kobayashi et al., 2009; Martin et al., 2007).

Gene Product	Gene	Taqman gene expression assay ID	RefSeq	Biomarker Group
Thyroid peroxidase	Tpo	Rn00571159_m1	NM_019353.1	Direct regulation of thyroid hormone Synthesis
NIS (sodium iodide symporter, solute carrier family 5)	Slc5a5	Rn00583900_m1	NM_05983.2	
Thyroglobulin	Tg	Rn00578496_m1	NM_030988.1	
Thyroid stimulating hormone receptor	Tshr	Rn00563612_m1	NM_012888.1	
Pendrin, solute carrier family 26, member 4;	Slc26a4	Rn00570082_m1	NM_019214.1	
Dual oxidase 1	Duox1	Rn00596688_m1	NM_153739.1	
Dual oxidase 2	Duox2	Rn00666512_m1	NM_024141.1	
Deiodinase 1	Dio1	Rn00572183_m1	NM_021653.3	
Pituitary tumor-transforming 1	Pttg1	Rn00574373_m1	NM_022391.2	Cell cycle regulation / cell death / cell proliferation / tumor genesis / tumor marker
Cyclin B1	Ccnb1	Rn00596848_m1	NM_171991.2	
Cyclin-dependent kinase 1	Cdk1	Rn00570728_m1	NM_019296.1	
Tumor protein p53	Tp53	Rn00755717_m1	NM_030989.3	
CAMP responsive element binding protein-like 2	Crebl2	Rn01492555_m1	NM_001015027.1	
Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Fas	Rn00685720_m1	NM_139194.2	
B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl2	Rn99999125_m1	NM_016993.1	
G-2 and S-phase expressed 1	Gtse1	Rn01506033_m1	NM_001130500.1	
Thyroid hormone receptor alpha	Thra	Rn01464140_m1	NM_031134.2; NM_001017960.1	Cell Signalling (upstream modulation of thyroid specific gene expression)
Thyroid hormone receptor beta	Thrb	Rn00562044_m1	NM_012672.2	
Aquaporin 1	Aqp1	Rn00562834_m1	NM_012778.1	
Hairy and enhancer of split 1	Hes1	Rn00577566_m1	NM_024360.3	
Notch 1	Notch1	Rn01758633_m1	NM_001105721.1	
Notch 2	Notch2	Rn01534371_m1	NM_024358.1	
NK2 homeobox 1	Nkx2-1	Rn01512482_m1	NM_013093.1	Thyroid transcription factors
forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	Foxe1	Rn00594363_s1	NM_138909.1	
Paired box 8	Pax8	Rn00579743_m1	NM_031141.2	
Thyroid stimulating hormone, beta	Tshb	Rn01534458_m1	NM_037248.1	Hormone (pituitary gland)
Beta-2 microglobulin	B2m	Rn00560865_m1	NM_012512.2	Housekeeping

176

177 B. Materials and Methods

178 Ethical statement. All rats and experiment procedures were approved by the local Ethical
179 Committee (Comité Institutionnel d’Ethique pour l’Animal de Laboratoire – Azur (C2EA-57), France) and

180 authorized by the French Ministry of Higher Education and Research. The studies were performed in
181 strict accordance with the Directive 2010/63/EU (Council 2010) and relevant French guidelines (Décret
182 2013-118 dated the 1st February 2013, from the French Ministry of Agriculture).

183 **Animal Housing and treatment.** Four *in vivo* studies were used in this work. In each case, male
184 Wistar Rj:W1 (IOPS HAN) provided by R. Janvier (Le Genest St Isle, France) were acclimatized at least 8
185 days before treatment, and were allocated to treatment group using a computerized randomization
186 procedure that ensures a similar body weight distribution among groups. PTU, NaClO₄ groups as well as
187 their relative control group consisted of 12 male rats. All other groups consisted of 15 male rats. The
188 acceptable body weight range was \pm 20% of the mean body weight the day of randomization. All rats
189 were at least 10 weeks of age at the start of the studies. Animals were housed individually during the
190 treatment phase and until sacrifice. Filtered and softened tap water, as well as food, certified rodent
191 pelleted and irradiated diet A04CP1-10 from S.A.F.E. (Scientific Animal Food and Engineering, Augy,
192 France), were available *ad libitum* until the last night before final sacrifice during which they were
193 dietary fasted. Clinical observations were performed daily. In the four studies, rats received treatment in
194 vehicle or vehicle only (control groups) by oral gavage. All animals were dosed daily for 7 days at 5 mL
195 per kilogram body weight.

196 **Dosing and experimental design.** In each study, groups of rats received by oral gavage either the
197 test substance (treated groups) or the vehicle solution, a 0.5% (wt/vol) aqueous methylcellulose solution
198 (control group), at a daily dose for 7 consecutive days, using a dose volume of 5 mL/kg body weight.
199 Sodium Iodide (CAS 7681-82-5), propylthiouracil (CAS 2954-52-1), sodium perchlorate (CAS 7601-89-0),
200 methimazole (CAS 60-56-0), amiodarone (CAS 19774-82-4), iprodione (CAS 36734-19-7), amitrol (CAS

61-82-5), lithium carbonate (CAS 554-13-2), and atrazine (CAS 1912-24-9) were purchased from Sigma-Aldrich (St.Quentin-Fallavier, France); and IOF (CAS 1144079-30-2) was obtained from Bayer CropScience (Lyon, France). All chemicals used in the present study were of the highest quality available and administered by oral gavage. PTU was administered at 0.4 and 2.8 mg/kg/d; MMI at 10 and 100 mg/kg/d; AMT at 25 and 100 mg/kg/d; Nal at 50 mg/kg/d; IOF at 500 mg/kg/d, AMI at 30 and 100 mg/kg/d; NaClO₄ at 0.5 and 5.0 mg/kg/d; LiCO₃ at 100 mg/kg/d; IPR at 150 mg/kg/d; and ATZ at 200 mg/kg/d.

A blood sample was collected from the abdominal aorta of each animal 24h after the last dose. Prior to blood collection, animals were anesthetized with isoflurane (Virbac, Carros, France) and weighed. Plasma and serum samples were isolated and stored frozen below -70°C for hormone analyses. Animals were exsanguinated before necropsy. Liver, pituitary gland, and thyroid (with parathyroid glands) were collected and weighed. Pituitary gland, liver samples, and one lobe of thyroid gland were flash-frozen in liquid nitrogen and conserved at -70°C until used for qPCR analysis. Second lobe of thyroid was preserved in 10% neutral buffered formalin (Carlo Erba Reagents, Italy) until histological examination.

Histopathology of thyroid gland. Thyroid gland samples conserved in formalin were embedded in paraffin and were sectioned at 5µm and stained with hematoxylin (Sigma, France) and eosin (Merck, France) for histological examination under light microscopy.

Immunohistochemistry on thyroid gland. Immunohistochemical staining was performed on 5 µm histological sections using antibodies against Ki-67 (Pharmingen reference 550609, Clone B56) according

221 to the manufacturer's instructions and using an autostainer, Discovery XT system (Ventana Medical
222 Systems, Illkirch, France). A portion of the duodenum was included to serve as a positive control for
223 staining due to its high rate of cell proliferation. A NanoZoomer scanner and NDPview software
224 (Hamamatsu) was used to count at least 1000 cells for each thyroid gland using whole slide image. The
225 indices of Ki-67-positive cells are a ratio of the number of cells stained to the total number of cells
226 counted multiplied by 1000.

227 **Hormone measurements.** After frozen storage of samples, plasma and serum samples were used
228 for hormone measurements. Total triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄) and thyrotropine (TSH) levels
229 were determined in each individual serum or plasma sample. Measurements were carried out the
230 Luminex MAP® technology (Multiplex assay kit, Merck-Millipore reference RPTMAG-86K) for TSH in rats
231 treated with AMT, LiCO₃, and ATZ, or using specific Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kits
232 (Supplied by Calbiotech, Spring Valley, CA, USA for T₃ and T₄, and by BlueGene Biotech, Putuo District,
233 Shanghai, China for TSH in other groups); according to the manufacturer instruction.

234 **Gene transcript measurements.** Total RNA was isolated from thyroid or pituitary gland lysate
235 samples using RNeasy Mini kits (Qiagen, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The
236 resulting total RNA was quantified using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA). RNA
237 integrity (28S/18S ratio) and purity was assessed using RNA 6000 nano assay LabChips (Agilent
238 Technologies, USA) and analyzed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Every samples
239 tested had an RNA integrity number (RIN) >8.0 (Agilent software) and were therefore used for further
240 analyses. A real-time quantitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) approach
241 was used with selected transcripts. cDNA was synthesized with 40 µg total RNA from each sample,

242 through a reverse transcription with random hexamer primer using the High Capacity cDNA Archive Kit
243 (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was then pre-amplified for
244 the endogenous control and target genes as described elsewhere (Devonshire et al., 2011) using
245 Taqman probes (Assay on demand; Applied Biosystems; RefSeq Summary in Table 2). RT-qPCR reactions
246 were performed using the same Taqman probes, 1/20 pre-amplified complementary DNA, and FastStart
247 Universal Probe Master Mix (Roche, Bâle, Switzerland) on a nanofluidic PCR system, the BioMark 48 × 48
248 dynamic arrays (Fluidigm, San Francisco, CA). Obtained fold change were normalized to obtain 1 as a
249 mean value for control groups, and therefore dispose of numeric values comparable between studies.
250 B2m was selected as reference gene.

251 *Statistical analyses.* Statistical analyses were performed as previously described (Kennel et al.,
252 2004) for body and organ weight parameters, cell proliferation, hormone measurements and gene
253 transcript measurements. Briefly, a one-way ANOVA was performed to determine whether there were
254 differences among all groups (p value 0.05), and then the Bonferroni posttest was performed to
255 determine the significance of the differences between the pair of groups. A p value 0.05 was considered
256 significant. The statistical tests were performed on GraphPad software (version 6.05, GraphPad
257 Software, Inc.).

258 C. RESULTS

259 1. Macroscopic examination

260 *Body and organ weights at necropsy.* (Table 3.) Total body weight at necropsy was only changed
261 in rats treated with LiCO3 and in rats treated with ATZ. Liver weight was increased 1.1-fold in rats
262 treated by IOF and in rats treated by IPR, and remained unchanged in all other treatment groups. No
263 treatment-related change was observed in pituitary gland weight, except a significant 0.85-fold

264 reduction caused by MMI at high dose (100 mg/kg/d) and ATZ at 200 mg/kg/d. Thyroid gland weight was
265 increased in a dose dependent manner in rats treated with compounds targeting TPO: PTU, MMI, and
266 AMT, respectively 2.16, 1.84, and 2-fold for the high dose groups. The same increasing tendency was
267 observed in rats treated with two of three substances releasing iodide: IOF and NaI, respectively
268 increased not significantly 1.25-fold and 1.2-fold. No change in thyroid gland weight was observed with
269 the other substances tested, well known for their toxicity on thyroid, as well as with those having no
270 potential for thyroid effects, IPR and ATZ.

271

272 Table V-3. Effect of treatment on relative body and organ (Thyroid, pituitary gland and liver) weight, in rats exposed to Propylthiouracyle
 273 (PTU; 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 100 mg/kg/day), Sodium Iodide (NaI; 50 mg/kg/day),
 274 Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 100 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO₃; 100 mg/kg/day), Sodium
 275 Perchlorate (NaClO₄; 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a
 276 percentage of the mean value in control group, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. A, compounds
 277 targeting TPO. B, compounds releasing iodide. C, compounds active through original toxic mode of action. D, compounds having no effect
 278 on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Test Compound mg/kg/d	PTU 0.4	PTU 2.8	MMI 10	MMI 100	AMT 25	AMT 100	NaI 50	AMI 25	AMI 100	IOF 150	LiCO ₃ 100	NaCl O4 0.5	NaClO ₄ 5.0	IPR 150	ATZ 200
Body Weight (% of control)	100.40	100.62	100.11	85.36	101.09	100.57	99.56	97.51	94.63	98.36	90.63**	99.86	99.87	98.54	85.65**
±SD	±3.68	±3.95	±5.72	±7.46	±5.79	±5.23	±3.14	±5.75	±7.12	±4.40	±6.49	±3.30	±4.37	±7.01	±6.28
Liver Weight (% of control)	100.81	104.86	110.49	95.79	107.57	112.93	109.71	97.24	98.70	112.86*	90.73	101.4 ₂	103.31	111.55*	92.96
±SD	±9.43	±7.57	±10.98	±13.52	±8.00	±16.40	±8.14	±4.47	±8.22	±10.29	±10.91	±7.83	±7.66	±9.29	±8.58
Pituitary gland Weight (% of control)	99.08	103.67	106.78	85.59**	103.94	97.64	129.31	100.85	91.53	135.34	89.76	107.3 ₄	102.75	97.46	85.04**
±SD	±10.09	±11.93	±16.10	±8.47	±11.81	±14.96	±75.86	±10.17	±10.1 ₇	±46.55	±8.66	±14.6 ₈	±15.60	±14.41	±11.81
Thyroid Weight (% of control)	164.37* *	216.09* **	183.85* **	183.85 ***	125.96	201.44 ***	118.65	103.13	101.04	124.60	106.73	110.91	101.72	93.75	92.31
±SD	±33.91	±43.68	±36.46	±36.45	±25.48	±62.72	±41.27	±14.06	±16.67	±30.56	±14.42	±25.86	±19.54	±13.02	±13.46
Function Group	A						B				C			D	

279
 280 2. Microscopic examination
 281 *Histopathological examination of thyroid.* Only thyroid from rats exposed to substances
 282 targeting TPO (MMI, PTU, and AMT) showed treatment-related changes. In respective high dose groups,
 283 follicular cell hypertrophy, hyperplasia and colloid alteration and /or depletion was observed (Fig.1.).

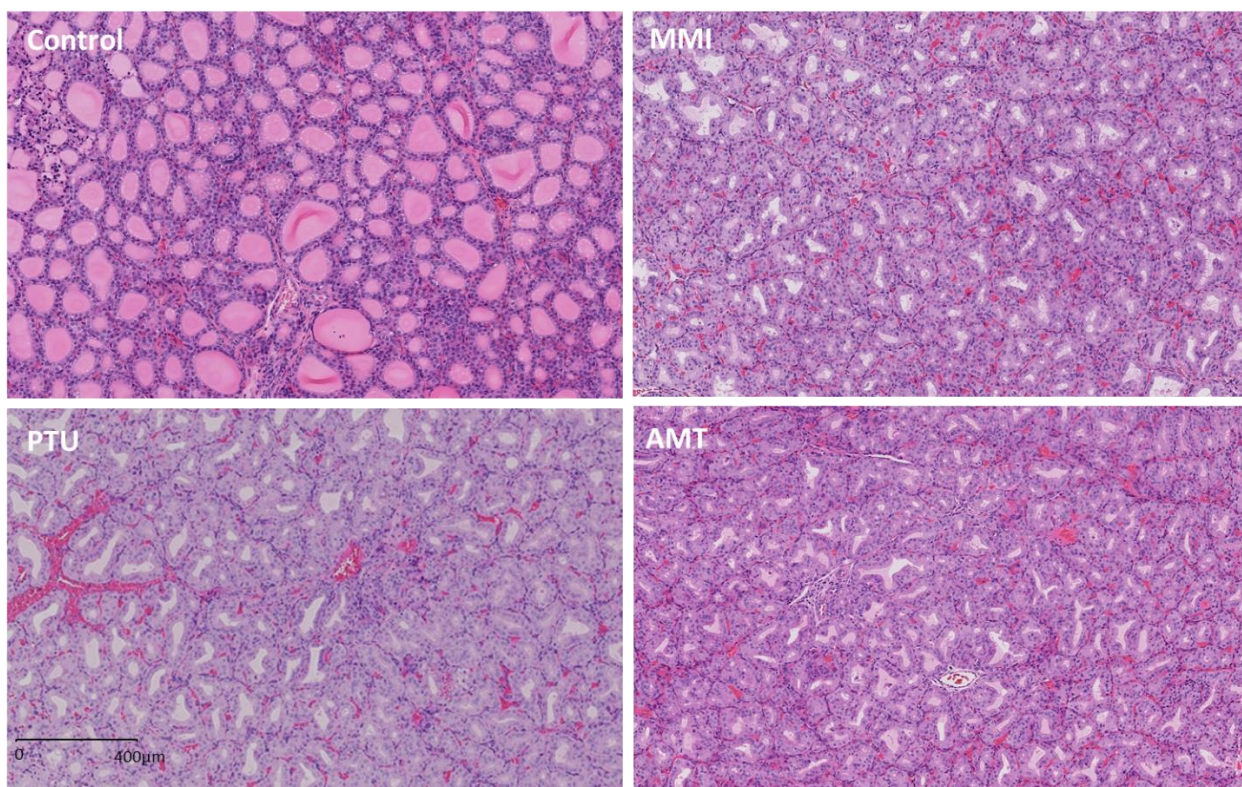


Figure V-1. Histological appearance of the thyroid from a control (Control) rat that received vehicle only; from a rat of the high-dose PTU, MMI, or AMT group rat that received respectively 2.8 mg/kg/d PTU, 100 mg/kg/d MMI or 100 mg/kg/d AMT for 7 days by oral gavage in methylcellulose. The control thyroid exhibits normal follicles of various size and shape containing abundant colloid. The PTU, MMI, or AMT-treated thyroid (PTU, MMI, or AMT) exhibits altered follicles with taller epithelium (follicular cell hypertrophy/hyperplasia) with a marked reduction in lumen size and colloid content (colloid depletion).

Proliferation of thyrocytes was increased only in rats treated with substances targeting TPO.

Cell proliferation in thyroid gland, estimated using KI67 immunostaining of histological sections was increased approximately 15-fold in high dose groups of rats treated with substances targeting TPO (PTU, MMI and AMT) compared to control groups or groups of rats treated with the substances that have no potential for thyroid effects, IPR and ATZ. It was not evaluated for technical reason in rats treated with NaI and IOF (Fig.2.). Thyroid cell KI67 proliferation index was not changed in rats treated with AMI, LiCO₃, NaClO₄ when compared to control levels.

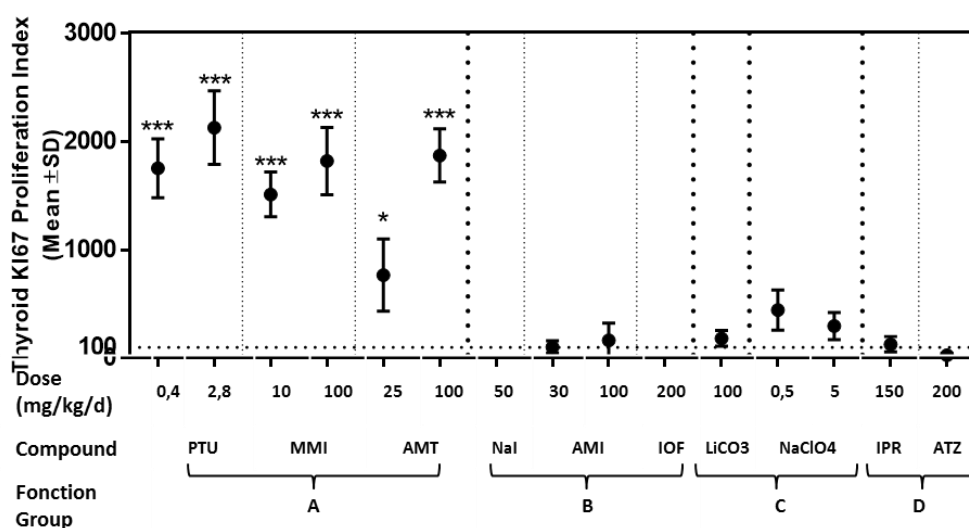


Figure V-2. Effect of treatment on the proliferation of thyrocytes in rats exposed to Propylthiouracyle (PTU; 0.4 & 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 10 & 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 25 & 100 mg/kg/day), Sodium Iodide (NaI; 50 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 30 & 100 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO₃; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO₄; 0.5 & 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a percentage of the KI67 proliferation index from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. Function group A designates compounds targeting TPO, these compounds led to a dose-dependant increase in the proliferation index. Function group B designates compounds releasing iodide, function group C compounds active through original toxic mode of action, and function group D the compounds having no effect on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

3. Effect of chemicals on circulating T₃, T₄, and TSH levels

Figure.3 presented data for thyroid-related circulating hormone levels, T₃, T₄ and TSH. The treatment of rats with chemical substances targeting TPO such as MMI, PTU or AMT resulted in moderate to marked dose-dependent decreases both in T₃ and T₄ hormones, with concomitant increases in TSH. In the MMI-, PTU- and AMT-treated groups, there were dose-dependent decreases in T₃ level, reaching the lowest value at high dose (45%, 9% and 26% of the vehicle control mean respectively). The same tendency of T₄ decrease was observed in these treated groups, with the lowest level reached at high dose (10%, 9% and 15% of the vehicle control mean respectively). In MMI- and AMT-treated groups, TSH level was mildly to markedly elevated (between 580% and 1000% of the vehicle control mean). For technical reason, the circulating TSH level in the PTU-treated group was not available.

319 AMI and IOF, mainly active via the release of iodide, significantly decreased circulating T₃ level in
320 each treated-rat group compared to that in control group (45% and 83% of the vehicle control mean,
321 respectively). Moreover, in these animal groups, no change in circulating T₄ level was observed, except
322 in the low-dose group of AMI-treated rats, with a 38% increase in T₄ level. In rats treated with NaI,
323 another chemical substance involved in the iodide release, circulating T₃ and T₄ levels was not changed
324 compared to control group values. Finally, the treatment of rats with AMI, IOF or NaI resulted in
325 moderate to marked increase, relatively to what was observed with substances targeting TPO, in
326 circulating TSH level compared to that in controls (between 148% and 219% of the vehicle control
327 mean).

328 NaClO₄ did not affect circulating T₃ and T₄ levels of treated rats compared to controls. For
329 technical reason, the circulating TSH level in the NaClO₄-treated group was not available.

330 In the LiCO₃-treated rat group, no change was observed in circulating T₃ and TSH levels compared
331 to those in control group, whereas a significant decrease of the circulating T₄ level (75% of the vehicle
332 control mean) was recorded. In rats treated with chemical substances having no potential for thyroid
333 effect, such as IPR or ATZ, no change in circulating T₃ and TSH levels was observed. However, a
334 significant decrease of circulating T₄ level in IPR and ATZ-treated rat groups was detected (17% and 51%
335 of the vehicle control mean respectively).

336

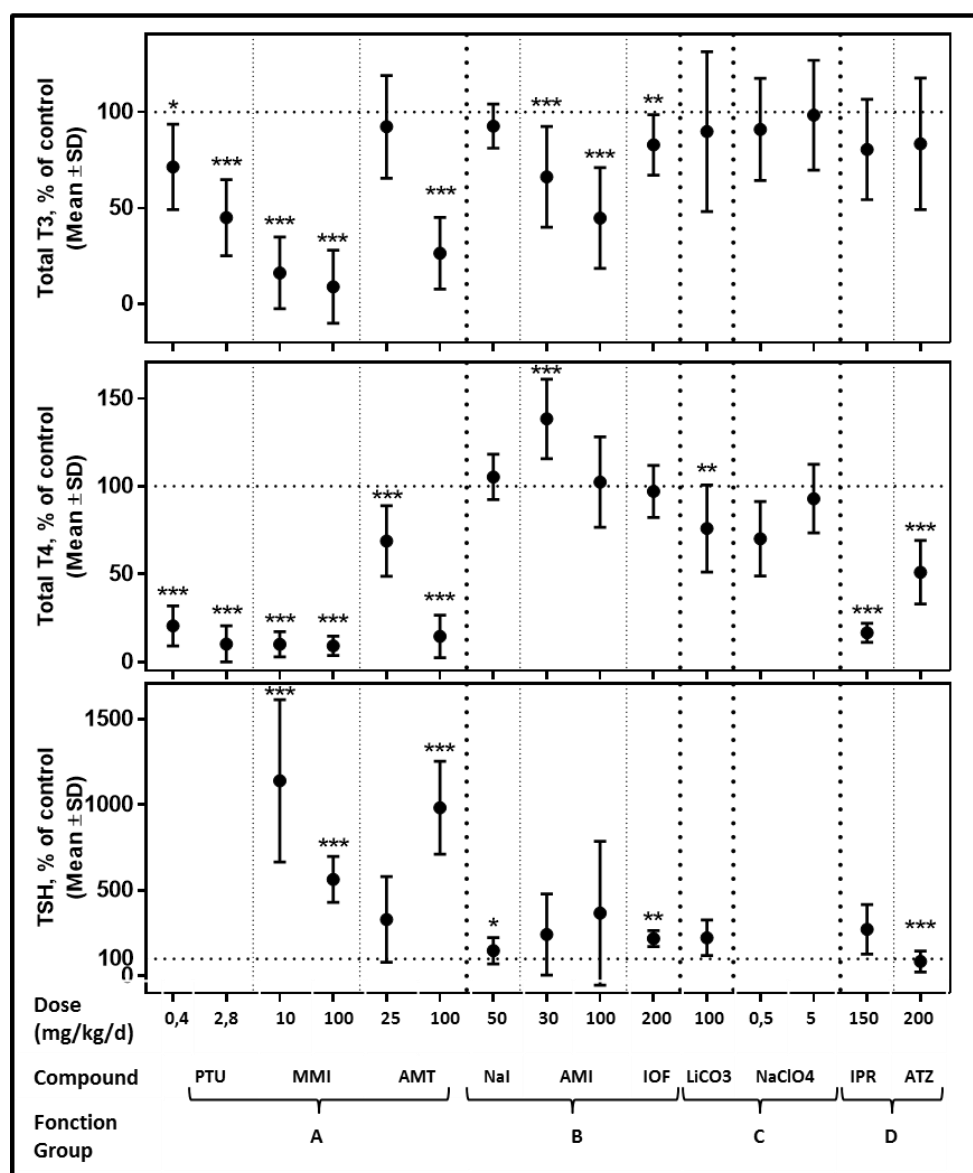


Figure V-3. Effect of treatment on total blood T_3 (top), T_4 (middle), and TSH (bottom) concentration in rats exposed to Propylthiouracil (PTU; 0.4 & 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 10 & 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 25 & 100 mg/kg/day), Sodium Iodide (NaI; 50 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 30 & 100 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO₃; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO₄; 0.5 & 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a percentage of concentration from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. Function group A designates compounds targeting TPO, function group B compounds releasing iodide, function group C compounds active through original toxic mode of action, and function group D the compounds having no effect on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4. Thyroid gland gene expression (qPCR)

Four sets of genes were selected and their expression patterns were established for each treatment group in rat thyroid glands, after 7 days.

Relative expression of major genes directly involved in thyroid hormone synthesis regulation (Tpo, Slc5a5, Tg, Tshr, Slc26a4, Duox1, Duox2, Dio1) after 7 days of treatment was affected in all groups of rats treated with thyroid toxicants and remained unchanged in rats treated with substances having no potential for thyroid disruption (Fig.4). In groups of rats treated with one of the toxicants targeting TPO (MMI, PTU and AMT), genes involved in direct regulation of thyroid hormone synthesis (here called thyroid hormone synthesis-related genes) relative mRNA quantities had very similar profiles. Slc5a5 mRNA relative quantity was increased approximately 4-fold, and Tg, Tshr, and Dio1 mRNA quantities are decreased approximately 0.5 fold decreased in all three (MMI, PTU, and AMT) relative high dose treatment groups. For technical reasons, Slc26a4 mRNA quantity was not detectable in rats treated with PTU and NaClO₄. Slc26a4, Tpo, and Duox1 mRNA relative quantity in thyroid of rats treated with MMI and AMT was not significantly different from control groups, whereas Tpo and Duox1 mRNA relative quantity in thyroid of rats treated with PTU were slightly but significantly increased 1.2-fold and decreased 0.8-fold respectively.

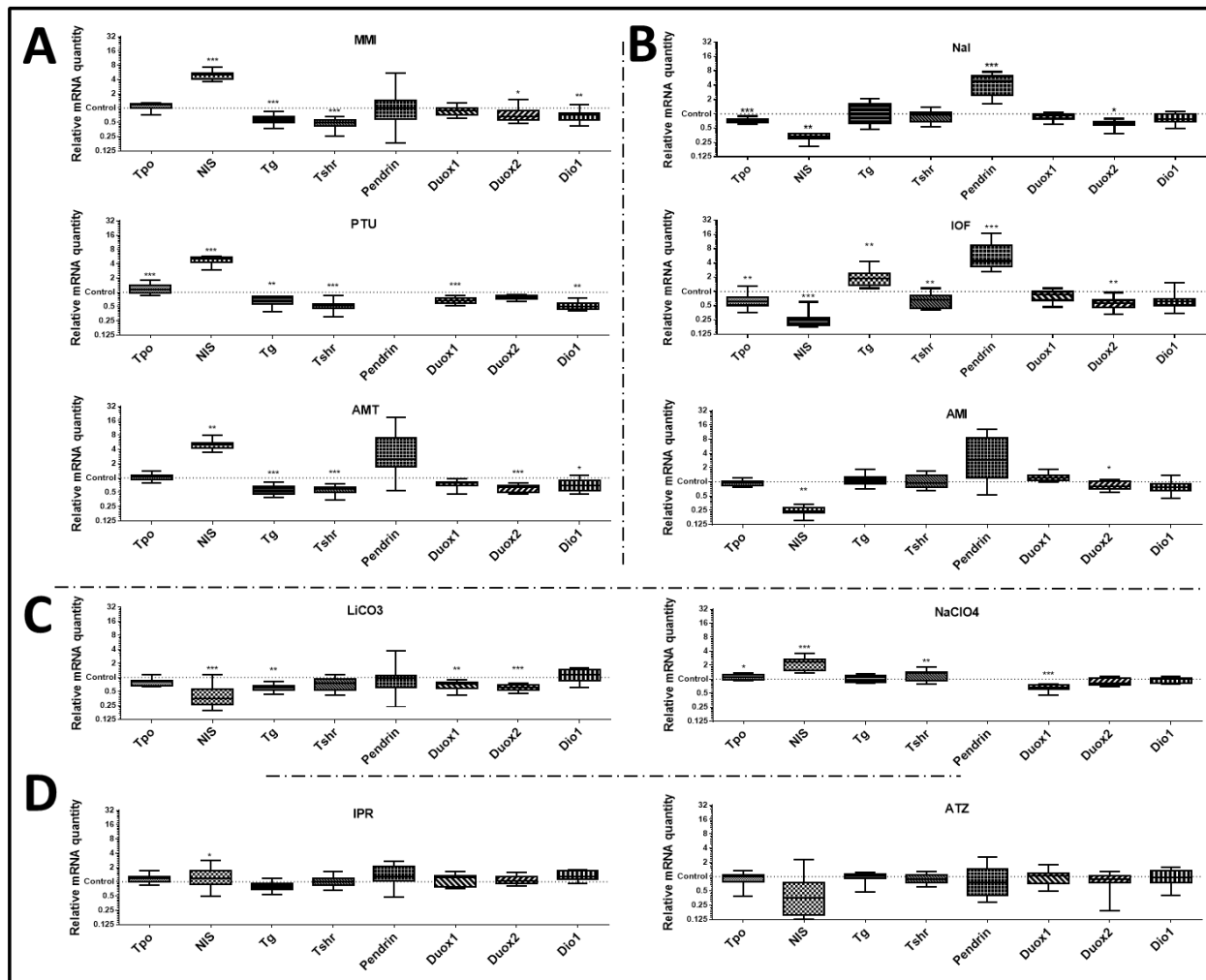


Figure V-4.. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in thyroid hormone synthesis regulation, Tyroperoxydase (Tpo), Sodium-iodide symporter (Slc5a5), Thyroglobulin (Tg), TSH receptor (Tshr), Pendrin (Slc26a4), Dual oxidase 1 & 2 (Duox1 & Duox2), and Diodinase 1 (Dio1), in rats exposed to Propylthiouracyle (PTU; 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 100 mg/kg/day), Sodium Iodide (Nal; 50 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 100 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO3; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO4; 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a fold change of quantity of mRNA of each gene in thyroid from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. A, compounds targeting TPO. B, compounds releasing iodide. C, compounds active through original toxic mode of action. D, compounds having no effect on the HPT axis. Deregulation profile of this selection of genes is different in rats treated with compounds having no effect on the HPT axis from in rats treated with compounds of other function groups. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

In groups of rats treated with one of the compounds releasing iodide, thyroid profiles regarding this set of genes were relatively similar, even if AMI high dose treatment led to a profile less contrasted compared to that in NaI and IOF groups. In rats treated with NaI, high

dose AMI, and IOF, thyroid Slc26a4 mRNA relative quantity was increased 4-fold compared to that in control group, even if not significantly in high dose AMI group. In rats treated with NaI, thyroid Tpo, Tg, and Duox2 mRNA relative quantity was decreased respectively 0.8-fold, 0.35-fold, and 0.6-fold. Slc5a5, Tshr, Duox1, and Dio1 mRNA relative quantity was unchanged. In thyroid of rats treated with AMI, Slc5a5 mRNA relative quantity was 0.25-fold decreased; Duox1 mRNA relative quantity was increased 1.2-fold; and Tpo, Tg, Duox2, Tshr, and Dio1 mRNA relative quantity was unchanged. In thyroid of rats treated with IOF, Tpo, Tshr, Duox2, mRNA relative quantity was decreased 0.7-fold; Tg mRNA relative quantity was decreased 0.25-fold; Slc5a5 mRNA relative quantity was increased approximately 2-fold; and Duox1 and Dio1 mRNA relative quantity was unchanged.

In LiCO₃ treatment-group, thyroid Tg, Tshr, and Duox2 mRNA relative quantity was decreased respectively 1.6, 1.8, and 1.6-fold; whereas Dio1 mRNA relative quantity was increased 1.15-fold only, though significantly. There was no significant change in Tpo, Slc5a5, Slc26a4, and Duox1 mRNA relative quantity. In thyroid of rats treated with NaClO₄, Duox1 mRNA relative quantity was decreased 0.6-fold, whereas Tpo, Slc5a5, and Tshr mRNA relative quantity was increased 1.35, 2.30, and 1.65-fold respectively. In contrast, Tg, Duox2, and Dio1 mRNA relative quantity was not significantly changed. For technical reason, the Slc26a4 expression was undetectable in thyroid of rats treated with NaClO₄.

Thyroid of rats treated with IPR and ATZ show similar and globally unchanged profiles regarding TH-related genes relative mRNA quantities when compared to controls, except a slight but significant increase of 0.85-fold for Tpo expression in IPR-treated group.

Relative expression of a second set of genes directly involved in cell cycle regulation / cell death / cell proliferation / tumor genesis / or used as tumor marker (Pttg1, Ccnb1, Cdk1, Tp53, Crebl2, Fas, Bcl2, Gtse1) after 7 days of treatment was not equally affected in all groups of rats treated with thyroid toxicants and showed slight significant changes in rats treated with ATZ, substance having no potential for thyroid toxicity (fig.5.). In groups of rats treated with one of the chemical substances targeting TPO (such as MMI, PTU or AMT), thyroid glands showed gene expression profiles very similar. Pttg1, Ccnb1, and Gtse1 mRNA relative quantity was significantly increased 4-fold; and Crebl2 and Bcl2 mRNA relative quantity was significantly decreased 0.5-fold. The 1.5-fold increase observed for Fas in all three high dose groups was significant only in thyroid of rats treated with AMT. Regarding other genes of this set, Cdk1 and TP53, thyroid of rats treated with PTU showed an original profile compared to thyroid high dose MMI and AMT groups that share a common one. Indeed, Cdk1 mRNA relative quantity was increased 9 to 10-fold in thyroid of rats treated with MMI and AMT whereas it was not changed in thyroid of rats treated with PTU. Showing smaller contrast, Tp53 mRNA relative quantity was slightly but significantly decreased in thyroid of rats treated with PTU whereas it was not changed in thyroid of rats treated with MMI and AMT.

In groups of rats treated with one of the substances releasing iodide (NaI, IOF, and AMI), Ccnb1, Cdk1, Tp53, and Crebl2, expression in thyroid glands did not change significantly compared to that in control group. The transcripts that were deregulated had an original profile in each group. In rats treated with NaI, thyroid Pttg1 and Fas mRNA relative quantity was decreased respectively 0.5, and 0.25-fold, Bcl2 relative quantity was increased

423 1.9-fold, and Gtse1 mRNA relative quantity was unchanged. In thyroid of rats treated with
424 AMI, mRNA relative quantity of the whole group of genes remained not significantly
425 changed. In thyroid of rats treated with IOF, Pttg1 and Gtse1 mRNA relative quantity was
426 increased 1.6-fold, whereas a decreasing tendency of Fas mRNA relative quantity was
427 observed.

428

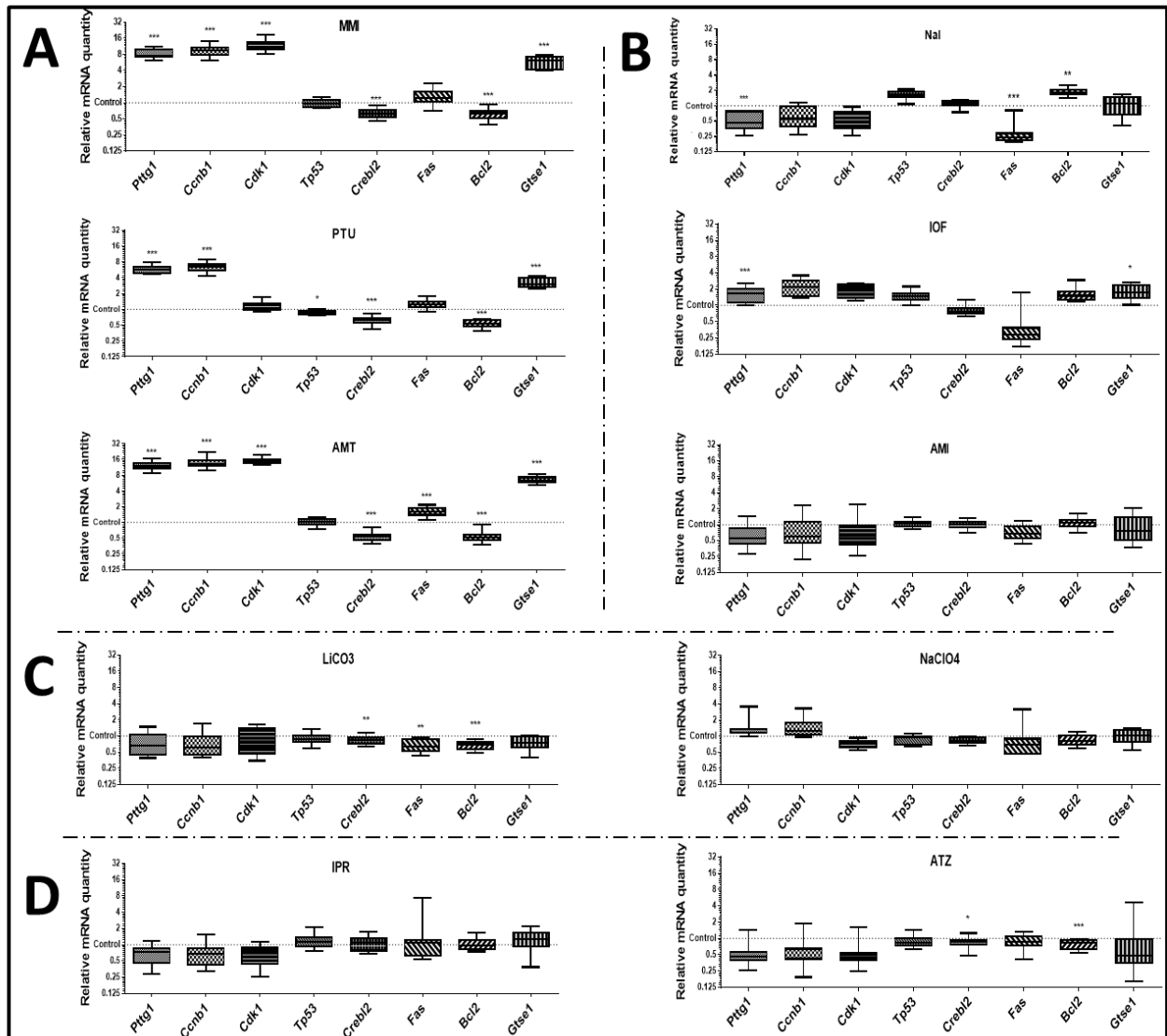


Figure V-5. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in cell cycle regulation / cell death / cell proliferation / tumor genesis / or used as tumor marker, Pituitary tumor-transforming 1 (Pttg1), Cyclin B1 (Ccnb1), Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), Tumor protein p53 (Tp53), CAMP responsive element binding protein-like 2 (Creb12), TNF receptor superfamily, member 6 (Fas), B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl2), G-2 and S-phase expressed 1 (Gtse1), in rats exposed to Propylthiouracil (PTU; 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 100 mg/kg/day), Sodium iodide (Nal; 50 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 100 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO3; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO4; 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a fold change of quantity of mRNA of each gene in thyroid from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. A, compounds targeting TPO. B, compounds releasing iodide. C, compounds active through original toxic mode of action. D, compounds having no effect on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Transcripts of this group of genes were globally not affected by LiCO_3 or NaClO_4 treatment. In thyroid of rats treated with LiCO_3 , Creb12, Fas, and Bcl2 mRNA relative quantity was decreased respectively 0.85, 0.7, and 0.7-fold compared to that in vehicle control group; and Pttg1, Ccnb1, Cdk1, Tp53, and Gtse1 mRNA relative quantity was not significantly changed. In thyroid of rats treated with NaClO_4 , no mRNA relative quantity of this group of genes was significantly changed, although Pttg1 and Ccnb1 mRNA relative quantity was increased not significantly approximately 2-fold.

Thyroid of rats treated with IPR and ATZ show similar and unchanged profiles regarding relative mRNA quantities of this group of genes when compared to controls. The only two statistically significant changes were observed for Creb12 and Bcl2 in rats treated with ATZ, and were only 1.15-fold.

Relative expression of a second set of genes directly involved in cell signaling and in signal transduction (Thra, Thrb, Aqp1, Hes1, Notch1, Notch2), after 7 days of treatment was not affected in all groups of rats treated with thyroid toxicants and showed slight significant changes in rats treated with ATZ and IPR, the two substances tested having no potential for thyroid toxicity (fig.6.). In thyroid glands from rats treated with one of the substances targeting TPO (MMI, PTU or AMT), profiles of mRNA relative quantities were similar between treatment groups. Aqp1 and Notch1 expression was respectively increased 1.3 to 2.3-fold and decreased 0.35 to 0.4 -fold compared to that in control group, whereas Thra, Thrb, and Notch2 decreased 0.65-fold, 0.45 to 0.35-fold, and 0.65-fold respectively. In contrast, Hes1 expression remained unchanged.

Transcript profiles obtained in thyroid of rats treated with one of the compounds releasing iodide (Nal, IOF, or AMI) were different between treatment groups. In thyroid of rats treated with Nal, Thra mRNA relative quantity was increased 1.4-fold compared to that in control group, whereas Notch2 mRNA relative quantity was significantly decreased 0.75-fold. In contrast, Thrb, Aqp1, Hes1, and Notch1 mRNA relative quantity remained unchanged. Thyroid of rat treated with IOF showed a different gene expression profile

469 regarding this third set of genes. Indeed, *Thrb*, *Hes1*, and *Notch2* mRNA relative quantity was
470 decreased respectively 0.65, 0.8, and 0.6-fold, whereas *Thra*, *Aqp1*, and *Notch1* mRNA
471 relative quantity remained unchanged. In contrast, thyroid of rat treated with AMI did not
472 show deregulated expression profiles for this set of genes.

473 Thyroid of rats treated with LiCO_3 and NaClO_4 also showed profiles relatively
474 unchanged, with small deregulations for this set of genes. The only changes observed were
475 in rats treated with LiCO_3 , with a decrease in *Thra* and *Hes1* mRNA relative quantity,
476 respectively 40% and 30%.

477 Thyroid of rats treated with IPR and ATZ show similar and globally unchanged profiles
478 regarding relative mRNA quantities of this set of genes when compared to controls. The only
479 two significant changes were observed for *Pax8* in rats treated with IPR, and for *Hes1* in rats
480 treated with ATZ. In both cases, the increase was slight, between 1.1 and 1.15-fold
481 compared to the vehicle control group.

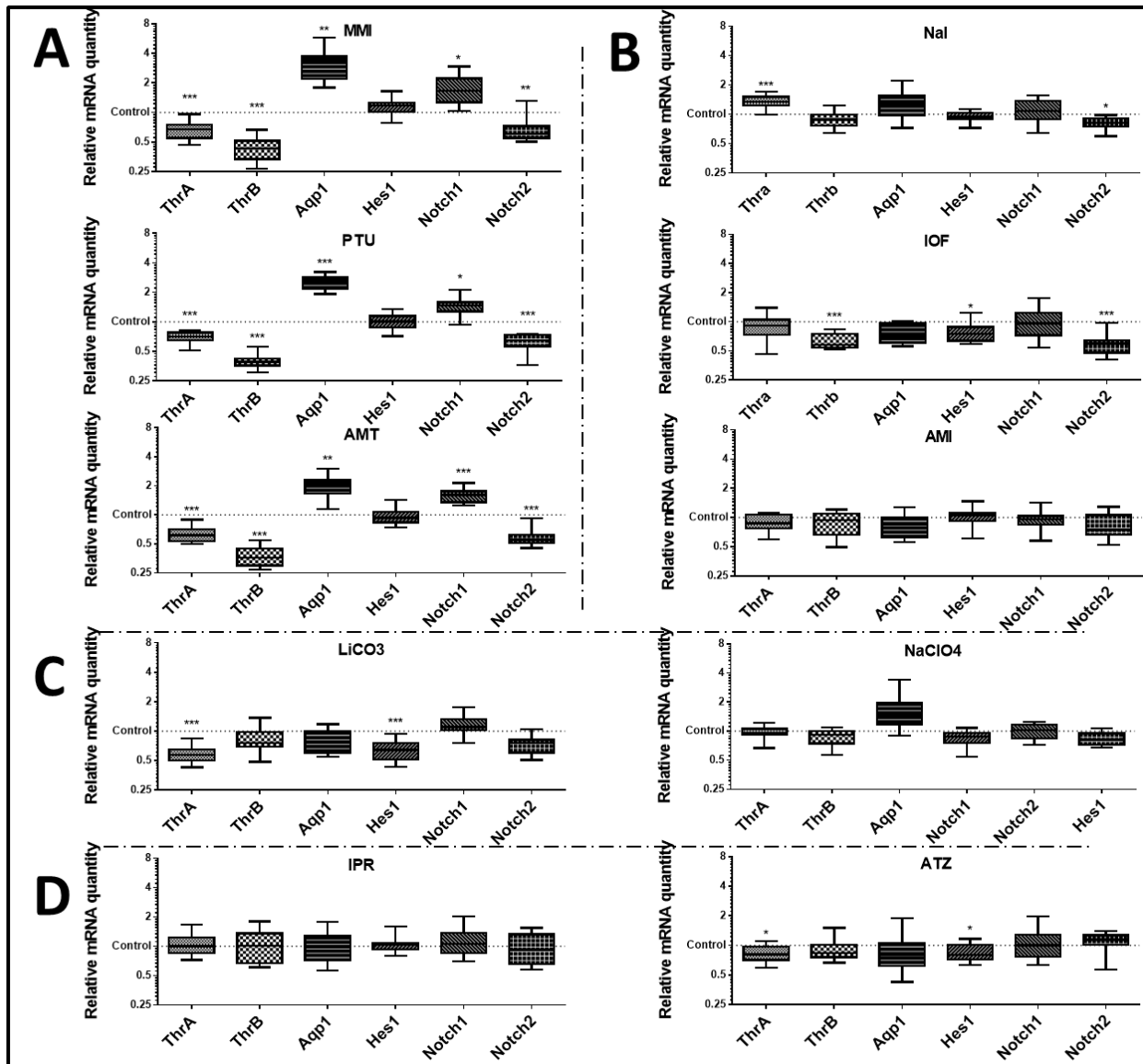


Figure V-6 Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes involved in cell signaling and in signal transduction. Thyroid hormone receptor alpha (Thra) Thyroid hormone receptor beta (Thrb) Aquaporin 1 (Aqp1) Hair cell enhancer of split 1 (Hes1), Notch 1, and Notch 2, in rats exposed to Propylthiouracil (PTU; 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 100 mg/kg/day), Sodium Iodide (Nal; 50 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 100 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO₃; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO₄; 5 mg/kg/day), Ipradone (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a fold change of quantity of mRNA of each gene in thyroid from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. A, compounds targeting TPO. B, compounds releasing iodide. C, compounds active through original mode of action. D, compounds having no effect on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Treatment with the thyroid toxicants led only in some cases in changes in relative quantity of transcripts of the two selected genes coding for thyroid transcription factors (Nkx2-1, Foxe1, Pax8). (fig.7.) In thyroid of rats treated with high dose of compounds targeting TPO (MMI, PTU, and AMT), Nkx2-1, Foxe1, and mRNA relative quantities were similarly decreased by 0.65 to 0.5-fold. Thyroid from rats treated with two compounds releasing iodide, NaI and IOF, also shared a deregulation profile, with Nkx2-1 mRNA relative quantity increased 4-fold, Pax8 decreased 0.4- to 0.6-fold, and Foxe1 not significantly changed. In contrast, rats treated with AMI showed no change in the mRNA relative quantity of these two genes. In thyroid from rats treated with LiCO₃, Foxe1 mRNA relative quantity was decreased 0.65-fold; and Nkx2-1 mRNA relative quantity was not changed. Expression of none of these two genes was deregulated in thyroid from rats treated with NaClO₄.

Relative quantity of the mRNA of these genes were not either changed in thyroid from rats treated IPR and ATZ, excepted a significant decrease of 0.6-fold in Nkx2-1 mRNA relative quantity in the ATZ treatment group.

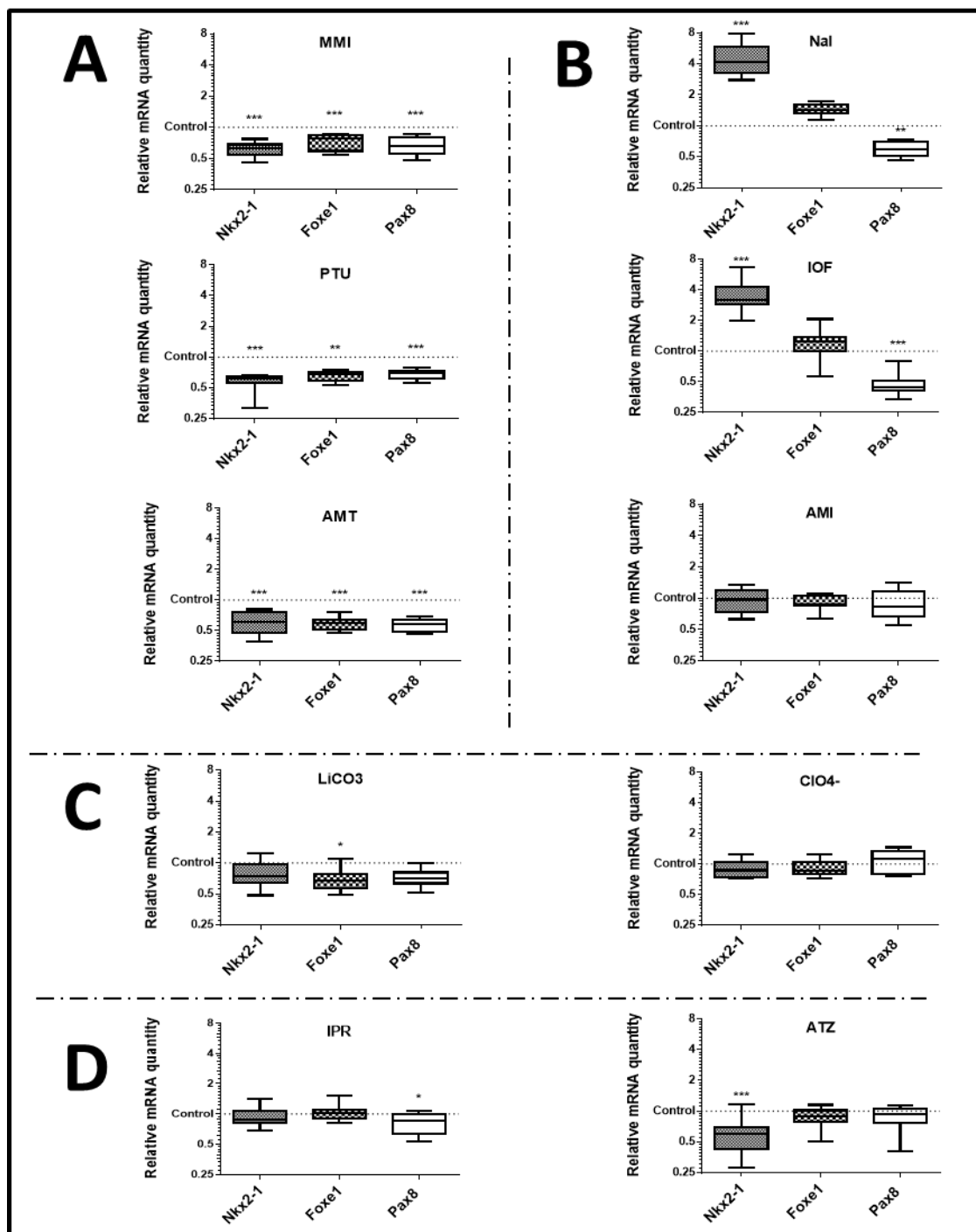


Figure V-7. Effect of treatment on relative quantities of transcripts of genes coding for thyroid transcription factors, NK2 homeobox 1 (Nkx2-1), forkhead box E1 or thyroid transcription factor 2 (Foxe1), and Paired box 8 (Pax8), in rats exposed to Propylthiouracyle (PTU; 2.8 mg/kg/day), Methimazole (MMI; 100 mg/kg/day), Amitrole (AMT; 100 mg/kg/day), Sodium iodide (Nal; 50 mg/kg/day), Iofensulfon Sodium (IOF; 200 mg/kg/day), Amiodarone (AMI; 100 mg/kg/day), Lithium Carbonate (LiCO₃; 100 mg/kg/day), Sodium Perchlorate (NaClO₄; 5 mg/kg/day), Iprodione (IPR; 150 mg/kg/day), and Atrazine (ATZ; 200 mg/kg/day). Results are presented as a fold change of quantity of mRNA of each gene in thyroid from Control rats exposed to the vehicle, arbitrarily designated 100%. Values are means \pm SD of 12-15 rats/data point. A, compounds targeting TPO. B, compounds releasing iodide. C, compounds active through original toxic mode of action. D, compounds having no effect on the HPT axis. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

518

519 D. Discussion

520 There are a variety of mechanisms that can lead to changes in the thyroid hormone
521 balance. Only the potential to affect thyroid hormone synthesis via TPO or NIS inhibition can
522 be screened using rapid *in vitro* assays (OECD, 2014, 2012b), and currently used *in vivo*
523 screening assays (Pubertal, IAMRSA, and Repeated Dose 28-d Oral Toxicity in Rats) are long
524 (around a full month of treatment), and the considered endpoints are not specific of the
525 consequences of endocrine initiated events (Becker et al., 2012). Thus we worked towards
526 the development of a short-term (7-day) rat *in vivo* assay for screening and testing of thyroid
527 toxicants, acting through different MIE.

528 Each parameter that we measured was evaluated for its capacity to be used in a 7-
529 day assay as a potential endpoint to determine if there is or not an alert regarding the
530 possibility of the compound tested to be a thyroid toxicant. A parameter was considered to
531 fit the criteria to be used as a potential endpoint when it was affected in every group of rats
532 treated with a thyroid toxicant and not or differently affected in rats treated with one of the
533 substances having no potential for thyroid effects.

534

1. Circulating hormone dosage and microscopic examination of the thyroid gland are not sufficient to identify thyroid toxicants in 7-days male rat studies

Among the classical endpoints used in this study, there were thyroid gland histopathology, the weight of the thyroid glands, cell proliferation study on thyroid gland, and levels of hormones in the blood such as TSH, T3 and T4. A series of validation studies and many reports have revealed that taken together, these parameters are sensitive and reliable for detection of thyroid effects, resulting from either inhibition of thyroidal iodide uptake or iodide organification, after a 15- to 30-day exposure of rats *in vivo* (Gelbke et al., 2007; Laws et al., 2003; O Connor et al., 2002; Stoker et al., 2006, 2002; Stump et al., 2014; Zorrilla et al., 2009).

In the present investigation, these standard endpoints were not sufficient to detect all the known thyroid toxicants tested. Nevertheless, compounds active on TPO (MMI, PTU, and AMT) induced changes in T3, T4, and TSH (TSH not measured in PTU treatment group, Fig. 2), an increase in the thyroid gland weight, hypertrophy and hyperplasia of thyrocytes (Fig.1), and an increase in the thyroid cell proliferation index determined using IHC (Fig3). Our results are consistent with the work of Noda et al. (2005) that succeeded in detecting AMT as a thyroid toxicant, thanks to dosing of circulating thyroid hormone and to a histological examination of the thyroid gland, by Hershberger 10-day assay using castrate-peripubertal male rats. From this investigation, it appears that classical endpoints measured in male rats in short-term assays are affected by toxicants targeting TPO. However, the same

experimental design did not lead to comparable changes in rats treated with the other thyroid toxicants tested (NaI, IOF, AMI, LiCO₃, and NaClO₄). Among them, only IOF treatment led to a decrease in T3 and a concomitant increase in TSH, whereas treatment with the two compounds not considered as thyroid toxicants, IPR and ATZ, led to significant decrease in T4 (Fig.2). None of them induced changes in thyroid cell proliferation index (fig. 3). Thus the sole combination of hormone dosage and histological examination of thyroid in 7-days male rat studies was not able to discriminate certain thyroid toxicants from compounds inducing changes in thyroid hormone due to unspecific effects.

In our investigation, it is interesting to observe that treatment with IPR and ATZ induced a decrease in circulating T4 since these data do not challenge the choice of these two compounds as compounds having no potential for thyroid toxicity. IPR and ATZ have both been extensively studied and no thyroid-related toxicity was reported in previous studies (Blystone et al., 2007; Laws et al., 2003; Rajkovic et al., 2010; Stoker et al., 2002). In a 7-day rat *in vivo* assay, the alteration of T4 homeostasis may therefore be considered as secondary to unspecific effects, rather than as a relevant marker for thyroid toxicity. It emphasizes the need to discriminate relevant endocrine-mediated effects from non-specific effects in toxicity studies.

2. Expression of a selection of genes was selectively affected by treatment with thyroid toxicants affecting the thyroid hormone synthesis

The overview of the overall gene expression profiles of thyroid of rats exposed to different compounds, given by figures 4, 5, 6, and 7, shows that changes in gene expression was more marked in thyroid toxicants-treated groups than in IPR- and ATZ-treated groups.

Thyroid toxicants could be detected only using thyroid expression profile of a short selection of genes. The expression of the genes of the first set, which are involved in thyroid hormone synthesis regulation (Tpo, Slc5a5, Tg, Tshr, Slc26a4, Duox1, Duox2, Dio1, fig.4), was affected in all groups of rats treated with thyroid toxicants and remained unchanged in rats treated with substances having no potential for thyroid toxicity, ATZ and IPR. Among this set of genes and regarding ATZ and IPR, only Tpo mRNA relative quantity was slightly increased in thyroid gland of rats treated with IPR. In comparison, in rats treated with thyroid toxicants, excepted with AMI for which the deregulation is only statistically significant for two genes of the set, four to six genes among the eight considered here were affected. We thus have in one hand almost unchanged profiles in rats treated with chemicals having no potential for thyroid toxicity, and in other hand deregulated profiles in rats treated with thyroid toxicants affecting thyroid hormone synthesis, suggesting that an assay screening the regulation of the thyroid hormone synthesis could rely on the examination of the relative expression of a limited number of genes.

Gene expression may be specific for each molecular initiating event (MIE). As shown

by fig. 4, 5, 6, 7, for each set of genes, the transcriptomic profiles obtained after treatment with PTU, MMI, or AMT, the three toxicants acting via inhibition of the TPO, were very similar. Even though the change of pendrin transcript expression in the thyroid of rats treated with PTU is unknown, the results show a similarity in gene expression profiles, including 18 genes among a total of 24 tested, in thyroid of rats treated with PTU, MMI, and AMT. In contrast, the gene expression profiles obtained in rats treated with all the other chemicals, i.e. non targeting TPO (Fig. 4, 5, 6, 7; B, C, & D.), were different from the one obtained in rats treated with PTU, MMI, and AMT. Hence, the overall transcriptomic profile shared by rats treated with targeted-TPO compounds may be specific of this MIE and not the consequence of general thyroid toxicity.

Likewise, overall relative gene expression profiles obtained in rats treated with Nal and IOF, known as or suspected to be thyroid toxicants because of the release of iodide in large excess, were similar (Fig. 4, 5, 6, 7, B). The similarity is especially high regarding the transcriptomic profile of genes encoding for proteins directly active on the regulation of thyroid hormone synthesis, as *Tpo*, *Slc5a5*, *Slc26a4*, and *Duox2* gene expression is deregulated in a similar way and magnitude in the two treatment groups (Fig.4, B), as well as the most highly deregulated transcripts such as *Fas* and *Nkx2-1* (Fig. 5 & 7; B). Thus, two iodide ion-releasing compounds, such as Nal and IOF, partially shared the same relative gene expression profile. The third iodide ion-releasing compound such as AMI, did not induce a gene expression profile similar to the one obtained in thyroid of rats treated with the both

other iodide ion-releasing compounds (NaI and IOF), suggesting the involvement of another toxic mode of action on thyroid. Indeed, the antagonist properties of AMI on Thra and Thr_b expression has been demonstrated *in vivo* in rats and *in vitro* (Bakker et al., 1994; van Beeren et al., 1995). Moreover, Van Beeren et al. (2012) reported that the administration of AMI to rats decreased peripheral deiodination of T₄ into T₃, whereas Pitsiavas et al. (1999) showed the inhibition of the TSH receptor signaling in the rat thyroid cell line FRTL5. Thus, the relative gene expression obtained from AMI-treated rats is different from the one with NaI or IOF treatment, since the toxic mode of action of these two chemicals is probably much more dependent of the excess of iodide. Thus, the difference in the profiles may reflect the marked difference between the toxic modes of action. Besides, it is noticeable that results obtained for the relative Slc5a5 expression in thyroid of rats treated with the three iodide ion-releasing compounds (NaI, AMI, and IOF) were not as expected. The extensively described escape from the Wolf-Chaikoff effect is attributed to the down regulation of the NIS at the transcriptional level (Eng et al., 1999). However the absence of such down-regulation in thyroid of rats treated with two iodide ion-releasing compounds in the present study is consistent with recent works, that highlight the coexistence of different mechanisms involved in iodide excess (Leoni et al., 2011).

In thyroid of rats treated with NaClO₄ and with LiCO₃, the transcriptomic profiles were original ones. This is in agreement with the hypothesis that each toxic mode of action leads to a specific gene expression profile, as suggested by the similarity between the

transcriptomic profiles in thyroid of rats treated with different compounds targeting TPO (PTU, MMI, and AMT) and between Nal and IOF, toxic through the iodide ion releasing.

Notch signaling pathway has been shown to be essential for the thyroid morphogenesis and differentiation during development, but also for the expression of thyroid-specific genes as NIS (Carre et al., 2011; Ferretti et al., 2008). Here we found that Notch 1 and 2, and Hes1 genes, all three belonging to the notch signaling pathway, were deregulated in a similar manner in the groups of rats exposed to compounds targeting TPO (MMI, PTU, or AMT), and in the groups of rats exposed to Nal and IOF that both release iodide (Fig.6.A & B). These results suggest a link between the modes of action involved and the transcriptional perturbation of the notch pathway.

The indication of the changes in gene expression is interesting in a screening context, since the results of the test give an orientation for further investigation in case of the detection of thyroid toxicity

3. Relevance of a 7-day male rat *in vivo* screening assay.

The present work indicates the ability of a 7-day rat *in vivo* study to detect and possibly discriminate toxicants of the thyroid hormone synthesis from compounds that are not thyroid toxicants, as long gene expression in thyroid of treated rats is investigated. In particular, the examination of the relative quantities of mRNAs of the selected genes encoding for proteins directly involved in the regulation of the thyroid hormone synthesis

appears sufficient to screen for thyroid toxicants. Such a 7-day assay could potentially be more informative than the IAMRSA and the male and female pubertal assays. Indeed, the lack of discrimination between compounds that have an action primarily related to thyroid hormone disruption from compounds for which potential changes in hormone concentration is secondary to unspecific toxicity constitutes the main weakness of these three assays regarding thyroid hormone disruption (Becker et al., 2012)

4. Further investigation on the 7-day model.

Very high similarity in transcriptomic profiles of thyroid of rats treated with three different thyroid toxicants targeting TPO in three different studies is a strong indication of the reproducibility of the results obtained in this assay. However, further investigation should be conducted since the apparent correlation between toxic mode of action and transcriptomic profiles has only been established for thyroid toxicants targeting TPO and remains to be established for the other toxic mode of action documented, for example inhibitors of the sodium/iodide symporter (NIS) such as thiocyanate or nitrate could be compared to NaClO₄.

E. Conclusion

The present work proposes a new model for screening thyroid toxicants, in a short-term 7-day *in vivo* rat study. Here we indicate the possibility of discriminating compounds

676 targeting directly the thyroid hormone synthesis from compounds that do not alter thyroid
677 function, by using regulation profiles of a selected set of genes. 7-day study for detecting
678 thyroid toxicants could constitute a refinement in the use of laboratory animals, compared
679 to male and female pubertal assays that last for 20 or 30 days. This short-term assay could
680 constitute an early alert system for the detection of compounds targeting the thyroid
681 function and therefore promotes the reduction of the number of animals used in toxicity
682 studies.

- 684 Abdelouahab, N., Suvorov, A., Pasquier, J.C., Langlois, M.F., Praud, J.P., Takser, L., 2009.
685 Thyroid disruption by low-dose BDE-47 in prenatally exposed lambs. *Neonatology* 96,
686 120–124. doi:10.1159/000209316
- 687 Al Khansa, I., Blanck, O., Guillouzo, A., Bars, R., 2010. Liverbeads: A practical and relevant in
688 vitro model for gene induction investigations. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1598–1604.
689 doi:10.1124/dmd.110.033753
- 690 Al-Dujaili, E.A.S., Kenyon, C.J., Nicol, M.R., Mason, J.I., 2011. Liquorice and glycyrrhetic acid
691 increase DHEA and deoxycorticosterone levels in vivo and in vitro by inhibiting adrenal
692 SULT2A1 activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 102–9. doi:10.1016/j.mce.2010.12.011
- 693 Andrade, B.M., Araujo, R.L., Perry, R.L., Souza, E.C., Cazarin, J.M., Carvalho, D.P., Ceddia, R.B.,
694 2011. A novel role for AMP-kinase in the regulation of the Na⁺/I⁻-symporter and iodide
695 uptake in the rat thyroid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1291–7.
696 doi:ajpcell.00136.2010 [pii]10.1152/ajpcell.00136.2010
- 697 Aqai, P., Frygan, C., Mizuguchi, M., Haasnoot, W., Nielen, M.W.F., 2012. Triple bioaffinity
698 mass spectrometry concept for thyroid transporter ligands. *Anal. Chem.* 84, 6488–93.
699 doi:10.1021/ac300543u
- 700 Aquila, S., De Amicis, F., 2014. Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete
701 functions. *Exp. Cell Res.* 328, 303–313. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.015
- 702 Attanasio, R., Scinicariello, F., Blount, B.C., Valentin-Blasini, L., Rogers, K.A., Nguyen, D.C.,
703 Murray, H.E., 2011. Pendrin mediates uptake of perchlorate in a mammalian in vitro
704 system. *Chemosphere* 84, 1484–1488. doi:S0045-6535(11)00429-2
705 [pii]10.1016/j.chemosphere.2011.04.038
- 706 Bakker, O., van Beeren, H.C., Wiersinga, W.M., 1994. Desethylamiodarone is a
707 noncompetitive inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone
708 beta 1-receptor protein. *Endocrinology* 134, 1665–1670.
709 doi:10.1210/endo.134.4.8137729
- 710 Balta, a. Z., Filiz, a. I., Kurt, Y., Sucullu, I., Yucel, E., Akin, M.L., 2012. Prognostic value of
711 oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med. Oncol.* 29, 734–741.
712 doi:10.1007/s12032-011-9969-x
- 713 Becker, R.A., Bergfelt, A.D.R., Borghoff, S., Davis, J.P., Hamby, B.T., Connor, J.C.O., Kaplan,
714 A.M., Sloan, C.S., Tyl, R.W., Wade, M., Marty, M.S., 2012. Interlaboratory Study
715 Comparison of the 15-Day Intact Adult Male Rat Screening Assay: Evaluation of an
716 Antithyroid Chemical and a Negative Control Chemical. *Birth defects Res.* 95, 63–78.
717 doi:10.1002/bdrb.20343
- 718 Bellinger, D.C., 2013. Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's
719 Neurodevelopment: An Update. *Saf. Health Work* 4, 1–11.
720 doi:10.5491/SHAW.2013.4.1.1

721 Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. WHO. State-of-the-science
722 of endocrine disrupting chemicals, 2012, Toxicology Letters.
723 doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020

724 Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? Environ.
725 Health Perspect. 112, 9–17.

726 Blystone, C.R., Lambright, C.S., Furr, J., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2007. Iprodione delays male
727 rat pubertal development , reduces serum testosterone levels , and decreases ex vivo
728 testicular testosterone production & 174, 74–81. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.010

729 Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., 2006. Environmental chemicals
730 and thyroid function. Eur. J. Endocrinol. 154, 599–611. doi:10.1530/eje.1.02128

731 Bock, K.W., 2011. From differential induction of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver to
732 characterization of responsible ligand-activated transcription factors, and their
733 multilevel crosstalk in humans. Biochem Pharmacol 82, 9–16. doi:S0006-
734 2952(11)00178-X [pii]10.1016/j.bcp.2011.03.011

735 Braun, D., Lelios, I., Krause, G., Schweizer, U., 2013. Histidines in potential substrate
736 recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8
737 (MCT8). Endocrinology 154, 2553–61. doi:10.1210/en.2012-2197

738 Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E., Bergman,
739 A., Visser, T.J., 1998. Interactions of persistent environmental organohalogens with the
740 thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and
741 human health. Toxicol Ind Heal. 14, 59–84.

742 Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA
743 expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive
744 androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor
745 alpha, and nuclear factor e. Drug Metab Dispos 37, 847–856. doi:dmd.108.024190
746 [pii]10.1124/dmd.108.024190 [doi]

747 Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase mRNA
748 Expression in Liver and Intestine by Activators of Aryl- Hydrocarbon Receptor ,
749 Constitutive Androstane Receptor , Pregnane X Receptor , Peroxisome Proliferator-
750 Activated Receptor [?] , and Nuclear Factor 37, 847–856.
751 doi:10.1124/dmd.108.024190.regarded

752 Butt, C.M., Wang, D., Stapleton, H.M., 2011. Halogenated phenolic contaminants inhibit the
753 in vitro activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. Toxicol. Sci. 124,
754 339–47. doi:10.1093/toxsci/kfr117

755 Calil-Silveira, J., Serrano-Nascimento, C., Nunes, M.T., 2012. Iodide treatment acutely
756 increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid
757 cell line by transcriptional mechanisms. Mol Cell Endocrinol 350, 118–124. doi:S0303-
758 7207(11)00710-6 [pii] 10.1016/j.mce.2011.12.002

759 Cao, J., Lin, Y., Guo, L.-H., Zhang, A.-Q., Wei, Y., Yang, Y., 2010. Structure-based investigation

on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with
thyroxine transport proteins. *Toxicology* 277, 20–8. doi:10.1016/j.tox.2010.08.012

Capen, C.C., 1994. Mechanisms of chemical injury of thyroid gland. *Prog. Clin. Biol. Res.* 387,
173–191.

Capri, Y., Friesema, E.C.H., Kersseboom, S., Touraine, R., Monnier, A., Eymard-Pierre, E., Des
Portes, V., De Michele, G., Brady, A.F., Boespflug-Tanguy, O., Visser, T.J., Vaur-Barriere,
C., 2013. Relevance of different cellular models in determining the effects of mutations
on SLC16A2/MCT8 thyroid hormone transporter function and genotype-phenotype
correlation. *Hum. Mutat.* 34, 1018–25. doi:10.1002/humu.22331

Cariou, B., Zaïr, Y., Staels, B., Bruckert, E., 2011. Effects of the new dual PPAR α/δ agonist
GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined
dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 34, 2008–14.
doi:10.2337/dc11-0093

Carre, A., Rachdi, L., Tron, E., Richard, B., Castanet, M., Schlumberger, M., Bidart, J.M.,
Szinnai, G., Polak, M., 2011. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and
differentiation during mouse thyroid gland development. *PLoS One* 6.
doi:10.1371/journal.pone.0016752

Carreón-Rodríguez, A., Charli, J.-L., Pérez-Martínez, L., 2009. T3 differentially regulates TRH
expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res.* 1305, 20–30.
doi:10.1016/j.brainres.2009.09.042

Chang, H., Hu, J., Shao, B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in
sewage treatment plants and receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3462–8.

Chauhan, K.R., Kodavanti, P.R., McKinney, J.D., 2000. Assessing the role of ortho-substitution
on polychlorinated biphenyl binding to transthyretin, a thyroxine transport protein.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 162, 10–21. doi:10.1006/taap.1999.8826

Chevalier, N., Fénichel, P., 2015. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of
type 2 diabetes? *Diabetes Metab.* 41, 107–115. doi:10.1016/j.diabet.2014.09.005

Chlouchi, A., Girard, C., Bonet, A., Viollon-Abadie, C., Heyd, B., Manton, G., Martin, H.,
Richert, L., 2007. Effect of chrysin and natural coumarins on UGT1A1 and 1A6 activities
in rat and human hepatocytes in primary culture. *Planta Med* 73, 742–747.
doi:10.1055/s-2007-981548 [doi]

Colborn, T., 2004. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ. Health Perspect.*
112, 944–949. doi:10.1289/ehp.6601

Craft, E.S., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2002. Comparative responsiveness of
hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in Long-Evans rats versus C57BL/6J
mice exposed to TCDD-like and phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners.
Toxicol Sci 68, 372–380.

Crofton, K.M., Zoeller, R.T., 2005. Mode of action: neurotoxicity induced by thyroid hormone
disruption during development--hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Crit Rev*

799 Toxicol 35, 757–769.

800 Cunha Lima, S.T., Nguyen, N.-H., Togashi, M., Apriletti, J.W., Nguyen, P., Polikarpov, I.,
801 Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Webb, P., 2009. Differential effects of TR ligands on hormone
802 dissociation rates: evidence for multiple ligand entry/exit pathways. *J. Steroid Biochem.*
803 *Mol. Biol.* 117, 125–31. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.08.003

804 De Gregorio, F., Pellegrino, M., Picchietti, S., Belardinelli, M.C., Taddei, A.R., Fausto, A.M.,
805 Rossi, M., Maggio, R., Giorgi, F., 2011. The insecticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-
806 chlorophenyl) ethane (DDT) alters the membrane raft location of the TSH receptor
807 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 121–9.
808 doi:10.1016/j.taap.2011.03.018

809 De Sandro, V., Catinot, R., Kriszt, W., Cordier, A., Richert, L., 1992. Male rat hepatic udp-
810 glucuronosyltransferase activity toward thyroxine. *Biochem. Pharmacol.*
811 doi:10.1016/0006-2952(92)90215-5

812 Delbès, G., Levacher, C., Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular
813 development. *Reproduction* 132, 527–38. doi:10.1530/rep.1.01231

814 Dellarco, V.L., McGregor, D., Berry, S.C., Cohen, S.M., Boobis, A.R., 2006. Thiazopyr and
815 thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance
816 Framework for analysis of a cancer mode of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 793–801.
817 doi:10.1080/10408440600975242

818 Devonshire, A.S., Elaswarapu, R., Foy, C. a, 2011. Applicability of RNA standards for
819 evaluating RT-qPCR assays and platforms. *BMC Genomics* 12, 118. doi:10.1186/1471-
820 2164-12-118

821 Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M.,
822 Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society
823 scientific statement. *Endocr Rev* 30, 293–342. doi:30/4/293 [pii]10.1210/er.2009-0002
824 [doi]

825 Dronjak, S., Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Varagic, V., 2007. Effects of noradrenaline and
826 serotonin reuptake inhibitors on pituitary-adrenocortical and sympatho-
827 adrenomedullar system of adult rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 614–20.

828 Ek, M., Soderdahl, T., Kuppers-Munther, B., Edsbacke, J., Andersson, T.B., Bjorquist, P.,
829 Cotgreave, I., Jernstrom, B., Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., 2007. Expression of
830 drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic
831 stem cells. *Biochem Pharmacol* 74, 496–503. doi:S0006-2952(07)00293-6
832 [pii]10.1016/j.bcp.2007.05.009

833 Elaković, I., Vasiljević, D., Adzic, M., Djordjevic, A., Djordjevic, J., Radojčić, M., Matić, G.,
834 2010. Sexually dimorphic functional alterations of rat hepatic glucocorticoid receptor in
835 response to fluoxetine. *Eur. J. Pharmacol.* 632, 79–85. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.015

836 Eng, P.H.K., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W.,
837 Braverman, L.E., 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a

838 decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein.
839 *Endocrinology* 140, 3404–3410. doi:10.1210/endo.140.8.6893

840 EPA, n.d. Tier 1 Screening Battery | Endocrine Disruptor Screening Program | US EPA.

841 European Commission, 2015. EC - Endocrine disruptors [WWW Document]. URL
842 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm (accessed
843 6.4.15).

844 Feng, F., Wang, H., Fu, H., Wu, S., Ye, Z., Chen, S., Li, J., n.d. Dedifferentiation of
845 differentiated thyroid carcinoma cell line FTC-133 is enhanced by 131I pretreatment.
846 *Nucl Med Biol* 38, 1053–1058. doi:S0969-8051(11)00054-0
847 [pii]10.1016/j.nucmedbio.2011.03.001

848 Fernández, L.P., López-Márquez, A., Santisteban, P., 2014. Thyroid transcription factors in
849 development, differentiation and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 29–42.
850 doi:10.1038/nrendo.2014.186

851 Ferretti, E., Tosi, E., Po, a, Scipioni, a, Morisi, R., Espinola, M.S., Russo, D., Durante, C.,
852 Schlumberger, M., Screpanti, I., Filetti, S., Gulino, a, 2008. Notch signaling is involved in
853 expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid
854 tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4080–7. doi:10.1210/jc.2008-0528

855 Finch, J.M., Osimitz, T.G., Gabriel, K.L., Martin, T., Henderson, W.J., Capen, C.C., Butler, W.H.,
856 Lake, B.G., 2006. A mode of action for induction of thyroid gland tumors by Pyrethrins
857 in the rat 214, 253–262. doi:10.1016/j.taap.2006.01.009

858 Fini, J.-B., Riu, A., Debrauwer, L., Hillenweck, A., Le Mével, S., Chevolleau, S., Boulahtouf, A.,
859 Palmier, K., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Demeneix, B.A., Zalko, D., 2012. Parallel
860 biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus*
861 as a model for endocrine perturbation studies. *Toxicol. Sci.* 125, 359–67.
862 doi:10.1093/toxsci/kfr312

863 Flynn, T.R., Hollenberg, A.N., Cohen, O., Menke, J.B., Usala, S.J., Tollin, S., Hegarty, M.K.,
864 Wondisford, F.E., 1994. A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor
865 selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J. Biol. Chem.* 269, 32713–6.

866 Fournel-Gigleux, S., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., Magdalou, J., 2010. The use of
867 hepatocytes to investigate UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases.
868 *Methods Mol. Biol.* 640, 309–26. doi:10.1007/978-1-60761-688-7_17

869 Freyberger, A., Ahr, H.-J., 2006. Studies on the goitrogenic mechanism of action of. *Stud.*
870 *goitrogenic Mech. action N,N,N?,N?-tetramethylthiourea* 217, 169–175.
871 doi:10.1016/j.tox.2005.09.005

872 Furuhashi, M., Suganuma, N., 2003. Effect of additional N-glycosylation signal in the N-
873 terminal region on intracellular function of the human gonadotropin alpha-subunit.
874 *Endocr. J.* 50, 245–53.

875 Fusco, a, Berlingieri, M.T., Di Fiore, P.P., Portella, G., Grieco, M., Vecchio, G., 1987. One- and
876 two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol.*

877 Cell. Biol. 7, 3365–3370. doi:10.1128/MCB.7.9.3365.Updated

878 Gelbke, H.P., Hofmann, A., Owens, J.W., Freyberger, A., 2007. The enhancement of the
879 subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active
880 chemicals: Comparison with toxicity tests of longer duration. Arch. Toxicol. 81, 227–
881 250. doi:10.1007/s00204-006-0148-3

882 Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., De Felice, M.,
883 Ambrosino, C., 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression.
884 Toxicology 304, 21–31. doi:10.1016/j.tox.2012.12.001

885 Gierach, I., Li, J., Wu, W.-Y., Grover, G.J., Wood, D.W., 2012. Bacterial biosensors for
886 screening isoform-selective ligands for human thyroid receptors α -1 and β -1. FEBS Open
887 Bio 2, 247–53. doi:10.1016/j.fob.2012.08.002

888 Giuliani, C., Bucci, I., Di, S., Rossi, C., Grassadonia, A., Piantelli, M., Napolitano, G., 2014. The
889 flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function.
890 FOOD Chem. Toxicol. 66, 23–29. doi:10.1016/j.fct.2014.01.016

891 Giuliani, C., Noguchi, Y., Harii, N., Napolitano, G., Tatone, D., Bucci, I., Piantelli, M., Monaco,
892 F., Kohn, L.D., 2008. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in
893 rat FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology 149, 84–92. doi:10.1210/en.2007-0618

894 Glatt, C.M., Ouyang, M., Welsh, W., Green, J.W., Connor, J.O., Frame, S.R., Everds, N.E.,
895 Poindexter, G., Snajdr, S., Delker, D. a., 2005. Molecular Characterization of Thyroid
896 Toxicity: Anchoring Gene Expression Profiles to Biochemical and Pathologic End Points.
897 Environ. Health Perspect. 113, 1354–1361. doi:10.1289/ehp.7690

898 Golstein, J., Kimura, T., Miot, F., Dumont, J.E., 1999. Loss of several cell functions including
899 okadaic acid-induced apoptosis after multiple passages in FRTL-5 cells. Mol. Cell.
900 Endocrinol. 150, 141–149. doi:10.1016/S0303-7207(99)00009-X

901 Groef, B. De, Decallonne, B.R., Geyten, S. Van Der, Darras, V.M., Bouillon, R., 2006.
902 Perchlorate versus other environmental sodium / iodide symporter inhibitors : potential
903 thyroid-related health effects 17–25. doi:10.1530/eje.1.02190

904 Grün, F., 2010. Obesogens. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes. 17, 453–459.
905 doi:10.1097/MED.0b013e32833ddea0

906 Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M.,
907 Kanno, J., Iguchi, T., Blumberg, B., 2006. Endocrine-disrupting organotin compounds are
908 potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol. Endocrinol. 20, 2141–55.
909 doi:10.1210/me.2005-0367

910 Hapgood, J.P., Koubovec, D., Louw, A., Africander, D., 2004. Not all progestins are the same:
911 implications for usage. Trends Pharmacol. Sci. 25, 554–7.
912 doi:10.1016/j.tips.2004.09.005

913 Hard, G., 1998. Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid
914 carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 106, 427–436.

915 Hashimoto, K., Zanger, K., Hollenberg, A.N., Cohen, L.E., Radovick, S., Wondisford, F.E., 2000.
916 cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-
917 releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J. Biol. Chem.* 275, 33365–
918 72. doi:10.1074/jbc.M006819200

919 Heaney, A.P., Nelson, V., Fernando, M., Horwitz, G., 2001. Transforming events in thyroid
920 tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86,
921 5025–5032. doi:10.1210/jc.86.10.5025

922 Hood, A., Hashmi, R., Klaassen, C.D., Proliferation, C., Hood, H., Pharmacol, C.D.T.A., 1999.
923 Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid-Follicular Cell Proliferation,
924 Hyperplasia, and Hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 163–170.

925 Hornung, M.W., Degitz, S.J., Korte, L.M., Olson, J.M., Kosian, P. a, Linnum, A.L., Tietge, J.E.,
926 2010. Inhibition of thyroid hormone release from cultured amphibian thyroid glands by
927 methimazole, 6-propylthiouracil, and perchlorate. *Toxicol. Sci.* 118, 42–51.
928 doi:10.1093/toxsci/kfq166

929 Hurley, P.M., Hill, R.N., Whiting, R.J., 1998. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides
930 Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents. *Environ. Health Perspect.* 106, 437.
931 doi:10.2307/3434175

932 INSERM, 2008. Cancer et Environnement. Expertise collective, INSERM.

933 Jahnke, G.D., Choksi, N.Y., Moore, J. a., Shelby, M.D., 2004. Thyroid toxicants: Assessing
934 reproductive health effects. *Environ. Health Perspect.* 112, 363–368.
935 doi:10.1289/ehp.6637

936 Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J., 2005. Organotin
937 compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome
938 proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol. Pharmacol.*
939 67, 766–74. doi:10.1124/mol.104.008409

940 Kato, Y., Ikushiro, S., Emi, Y., Tamaki, S., Suzuki, H., Sakaki, T., Yamada, S., Degawa, M., 2008.
941 Hepatic UDP-Glucuronosyltransferases Responsible for Glucuronidation of Thyroxine in
942 Humans ABSTRACT : 36, 51–55. doi:10.1124/dmd.107.018184.glucuronidation

943 Kennel, P.F., Pallen, C.T., Bars, R.G., 2004. Evaluation of the rodent Hershberger assay using
944 three reference endocrine disrupters (androgen and antiandrogens). *Reprod. Toxicol.*
945 18, 63–73. doi:10.1016/j.reprotox.2003.10.012

946 Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001.
947 Regulation of thyroid cell proliferation by tsh and other factors: A critical evaluation of
948 in vitro models. *Endocr. Rev.* 22, 631–656. doi:10.1210/er.22.5.631

949 King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D., Tephly, T.R., 2000. UDP-Glucuronosyltransferases 143–
950 161.

951 Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H.,
952 Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., 2005. Anti-thyroid hormonal activity of
953 tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the

954 mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.*
955 76, 1589–601. doi:10.1016/j.lfs.2004.08.030

956 Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2011. Toxicologic Pathology Effects of Microsomal Enzyme
957 Inducers on Thyroid Follicular Cell. doi:10.1080/019262301301418838

958 Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2001. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular
959 cell proliferation and thyroid hormone metabolism. *Toxicol Pathol* 29, 34–40.

960 Klammer, H., Schlecht, C., Wuttke, W., Schmutzler, C., Gotthardt, I., Kohrle, J., Jarry, H., 2007.
961 Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the
962 function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology* 238, 192–
963 199. doi:S0300-483X(07)00324-1 [pii]10.1016/j.tox.2007.06.088

964 Klecha, A.J., Barreiro Arcos, M.L., Frick, L., Genaro, A.M., Cremaschi, G., 2008. Immune-
965 endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation* 15,
966 68–75. doi:10.1159/000135626

967 Kobayashi, K., Akune, H., Sumida, K., Saito, K., Yoshioka, T., Tsuji, R., 2009. Perinatal
968 exposure to PTU decreases expression of Arc, Homer 1, Egr 1 and Kcna 1 in the rat
969 cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1264, 24–32.
970 doi:10.1016/j.brainres.2008.12.029

971 Kodavanti, P.R.S., Curras-Collazo, M.C., 2010. Neuroendocrine actions of organohalogenes:
972 thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.*
973 31, 479–96. doi:10.1016/j.yfrne.2010.06.005

974 Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T., 1987. Thyroid hormones regulate levels
975 of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad*
976 *Sci U S A* 84, 7329–7333.

977 Kotake, Y., 2012. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals.
978 *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1876–80.

979 Larsen, D.A., Swanson, P., Dickey, J.T., Rivier, J., Dickhoff, W.W., 1998. In vitro thyrotropin-
980 releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon,
981 *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 276–85.
982 doi:10.1006/gcen.1997.7031

983 Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Cooper, R.L., 2003. Pubertal development in female
984 Wistar rats following exposure to propazine and atrazine biotransformation by-
985 products, diamino-5-chlorotriazine and hydroxyatrazine. *Toxicol Sci* 76, 190–200.
986 doi:10.1093/toxsci/kfg223kfg223 [pii]

987 Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J., Cooper, R.L., 2000. The Effects of Atrazine on
988 Female Wistar Rats : An Evaluation of the Protocol for Assessing Pubertal Development
989 and Thyroid Function. *Toxicol. Sci.* 376, 366–376.

990 Lecat-guillet, N., Merer, G., Lopez, R., Pourcher, T., 2008. Small-Molecule Inhibitors of
991 Sodium Iodide Symporter Function 06107, 889–895. doi:10.1002/cbic.200700682

- 992 Leoni, S.G., Galante, P.A., Ricarte-Filho, J.C., Kimura, E.T., 2008. Differential gene expression
993 analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics* 91, 356–366.
994 doi:S0888-7543(08)00017-7 [pii]10.1016/j.ygeno.2007.12.009
- 995 Leoni, S.G., Kimura, E.T., Santisteban, P., De la Vieja, A., 2011. Regulation of thyroid oxidative
996 state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess.
997 *Mol Endocrinol* 25, 1924–1935. doi:me.2011-0038 [pii]10.1210/me.2011-0038
- 998 Lévy-Bimbot, M., Major, G., Courilleau, D., Blondeau, J.-P., Lévi, Y., 2012.
999 Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: use
1000 of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding.
1001 *Chemosphere* 87, 782–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.080
- 1002 Lezoualc'h, F., Hassan, A.H., Giraud, P., Loeffler, J.P., Lee, S.L., Demeneix, B.A., 1992.
1003 Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent
1004 inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick
1005 hypothalamic neurons. *Mol. Endocrinol.* 6, 1797–804. doi:10.1210/mend.6.11.1480171
- 1006 Lowry, C.A., Hale, M.W., Plant, A., Windle, R.J., Shanks, N., Wood, S.A., Ingram, C.D., Renner,
1007 K.J., Lightman, S.L., Summers, C.H., 2009. Fluoxetine inhibits corticotropin-releasing
1008 factor (CRF)-induced behavioural responses in rats. *Stress* 12, 225–39.
1009 doi:10.1080/10253890802309861
- 1010 Lv, M., Zhang, X., Li, M., Chen, Q., Ye, M., Liang, W., Ding, L., Cai, H., Fu, D., Lv, Z., 2013. miR-
1011 26a and its Target CKS2 Modulate Cell Growth and Tumorigenesis of Papillary Thyroid
1012 Carcinoma. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0067591
- 1013 Ma, X., Lian, Q.-Q., Dong, Q., Ge, R.-S., 2011. Environmental inhibitors of 11 β -hydroxysteroid
1014 dehydrogenase type 2. *Toxicology* 285, 83–9. doi:10.1016/j.tox.2011.04.007
- 1015 Mackenzie, P.I., Bock, K.W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O.,
1016 Owens, I.S., Nebert, D.W., 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP
1017 glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15, 677–685.
1018 doi:01213011-200510000-00001 [pii]
- 1019 Marchesini, G.R., Meulenberg, E., Haasnoot, W., Mizuguchi, M., Irth, H., 2006. Biosensor
1020 recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. *Anal. Chem.* 78,
1021 1107–14. doi:10.1021/ac051399i
- 1022 Martin, M.T., Brennan, R.J., Hu, W., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H., Wood, C.R., Corton, J.C.,
1023 Kavlock, R.J., Dix, D.J., 2007. Toxicogenomic study of triazole fungicides and
1024 perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on
1025 mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* 97, 595–613. doi:10.1093/toxsci/kfm065
- 1026 Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M., 2009.
1027 The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3
1028 catabolism in macrophages. *Toxicol. Sci.* 109, 50–8. doi:10.1093/toxsci/kfp044
- 1029 Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmacokinetics
1030 of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and

1031 identification of knowledge gaps. Crit. Rev. Toxicol. 44, 696–724.
 1032 doi:10.3109/10408444.2014.930813

1033 McClain, R.M., 1995. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid
 1034 neoplasia to human risk assessment. Mutat. Res. 333, 131–142. doi:10.1016/0027-
 1035 5107(95)00139-5

1036 McClain, R.M., Levin, A.A., Posch, R., Downing, J.C., 1989. The effect of phenobarbital on the
 1037 metabolism and excretion of thyroxine in rats. Toxicol Appl Pharmacol 99, 216–228.
 1038 doi:0041-008X(89)90004-5 [pii]

1039 McClain, R.M., Posch, R.C., Bosakowski, T., Armstrong, J.M., 1988. Studies on the mode of
 1040 action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. Toxicol Appl
 1041 Pharmacol 94, 254–265.

1042 Mcdougal, J.N., Jones, K.L., Fatuyi, B., Gray, K.J., Blount, B.C., Valentín-blasini, L., Fisher, J.W.,
 1043 2011. Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues The
 1044 Effects of Perchlorate on Thyroidal Gene Expression are Different from the Effects of
 1045 Iodide Deficiency 37–41. doi:10.1080/15287394.2011.573740

1046 McLean, A.E., Driver, H.E., Sutherland, I.A., 1992. Liver tumour promotion by phenobarbital:
 1047 comparison of rat and human studies. Prog Clin Biol Res 374, 251–259.

1048 Meek, M.E.B., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKeeman, L.D.,
 1049 Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D.E., 2003. A framework for human
 1050 relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. Crit. Rev. Toxicol.
 1051 33, 591–653. doi:10.1080/713608373

1052 Meireles, A.M., Preto, A., Rocha, A.S., Rebocho, A.P., Maximo, V., Pereira-Castro, I., Moreira,
 1053 S., Feijao, T., Botelho, T., Marques, R., Trovisco, V., Cirnes, L., Alves, C., Velho, S., Soares,
 1054 P., Sobrinho-Simoes, M., 2007. Molecular and genotypic characterization of human
 1055 thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. Thyroid 17, 707–715.
 1056 doi:10.1089/thy.2007.0097

1057 Merrill, E.A., Clewell, R.A., Gearhart, J.M., Robinson, P.J., Sterner, T.R., Yu, K.O., Mattie, D.R.,
 1058 Fisher, J.W., 2003. PBPK Predictions of Perchlorate Distribution and Its Effect on Thyroid
 1059 Uptake of Radioiodide in the Male Rat. Toxicol. Sci. 73, 256–269.
 1060 doi:10.1093/toxsci/kfg080

1061 Mijiddorj, T., Kanasaki, H., Purwana, I.N., Oride, A., Miyazaki, K., 2011. Stimulatory effect of
 1062 pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I
 1063 receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells.
 1064 Mol. Cell. Endocrinol. 339, 172–9. doi:10.1016/j.mce.2011.04.010

1065 Miller, M.D., Crofton, K.M., Rice, D.C., Zoeller, R.T., 2009. Thyroid-disrupting chemicals:
 1066 interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. Env. Heal. Perspect 117, 1033–
 1067 1041. doi:10.1289/ehp.0800247 [doi]

1068 Miot, F., Dupuy, C., Dumont, J., Rousset, B., 2000. Thyroid Hormone Synthesis and Secretion,
 1069 in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman,

- 1070 J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O.
1071 (Eds.), . South Dartmouth (MA).
- 1072 Monte, M., Benetti, R., Buscemi, G., Sandy, P., Del Sal, G., Schneider, C., 2003. The cell cycle-
1073 regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting
1074 p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 30356–30364. doi:10.1074/jbc.M302902200
- 1075 Moon, M.K., Jeong, I.-K., Oh, T.J., Ahn, H.Y., Kim, H.H., Park, Y.J., Jang, H.C., Park, K.S., 2015.
1076 Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin
1077 resistance. *J. Endocrinol.* doi:10.1530/JOE-14-0714
- 1078 Mullur, R., Liu, Y.-Y., Brent, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol.*
1079 *Rev.* 94, 355–82. doi:10.1152/physrev.00030.2013
- 1080 Murk, A.J., Rijntjes, E., Blaauboer, B.J., Clewell, R., Crofton, K.M., Dingemans, M.M.L., Furlow,
1081 J.D., Kavlock, R., Köhrle, J., Opitz, R., Traas, T., Visser, T.J., Xia, M., Gutleb, A.C., 2013.
1082 Toxicology in Vitro Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for
1083 identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicol. Vit.* 27, 1320–1346.
1084 doi:10.1016/j.tiv.2013.02.012
- 1085 Newbold, R.R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol.*
1086 *Appl. Pharmacol.* 199, 142–50. doi:10.1016/j.taap.2003.11.033
- 1087 Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N., 2009. Environmental estrogens and
1088 obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–9. doi:10.1016/j.mce.2009.02.024
- 1089 Nishimura, N., Nishimura, H., Ito, T., Miyata, C., Izumi, K., Fujimaki, H., Matsumura, F., 2009.
1090 Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its
1091 inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity.
1092 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 301–9.
- 1093 Noda, S., Muroi, T., Takakura, S., Sakamoto, S., Takatsuki, M., Yamasaki, K., Tateyama, S.,
1094 Yamaguchi, R., 2005. Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid
1095 function modulators. *Arch. Toxicol.* 79, 627–635. doi:10.1007/s00204-005-0677-1
- 1096 O Connor, J.C., Frame, S.R., Ladics, G.S., 2002. Evaluation of a 15-day screening assay using
1097 intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators.
1098 *Toxicol. Sci.* 69, 79–91. doi:10.1093/toxsci/69.1.79
- 1099 OECD, 2014. New Scoping Document on in vitro and ex vivo Assays for the Identification of
1100 Modulators of Thyroid Hormone Signalling.
- 1101 OECD, 2012a. Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel in vitro and in vivo
1102 Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors.
- 1103 OECD, 2012b. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals
1104 for Endocrine Disruption.
- 1105 OECD, 2006a. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays, Series on
1106 Testing and Assessment. OECD.
- 1107 OECD, 2006b. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assay.

1108 Ohba, K., Sasaki, S., Matsushita, A., Iwaki, H., Matsunaga, H., Suzuki, S., Ishizuka, K., Misawa,
1109 H., Oki, Y., Nakamura, H., 2011. GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-
1110 induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. *PLoS One* 6, e18667.
1111 doi:10.1371/journal.pone.0018667

1112 Olsen, J.H., Wallin, H., Boice Jr., J.D., Rask, K., Schulgen, G., Fraumeni Jr., J.F., 1993.
1113 Phenobarbital, drug metabolism, and human cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*
1114 2, 449–452.

1115 Ortega, E., Osorio, A., Ruiz, E., 1996. Inhibition of 5'DI and 5'DII L-tiroxine (T4)
1116 monodeiodinases. Effect on the hypothalamo-pituitary ovarian axis in adult
1117 hypothyroid rats treated with T4. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 853–860.

1118 Papineni, S., Marty, M.S., Rasoulpour, R.J., LeBaron, M.J., Pottenger, L.H., Eisenbrandt, D.L.,
1119 2015. Mode of action and human relevance of pronamide-induced rat thyroid tumors.
1120 *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 541–551. doi:10.1016/j.yrtph.2015.02.012

1121 Park, J.W., Zarnegar, R., Kanauchi, H., Wong, M.G., Hyun, W.C., Ginzinger, D.G., Lobo, M.,
1122 Cotter, P., Duh, Q.Y., Clark, O.H., 2005. Troglitazone, the peroxisome proliferator-
1123 activated receptor-gamma agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in
1124 human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 15, 222–231. doi:10.1089/thy.2005.15.222

1125 Patrick, L., 2009. Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health.
1126 *Altern Med Rev* 14, 326–346.

1127 Paul, K.B., Hedge, J.M., Macherla, C., Filer, D.L., Burgess, E., Simmons, S.O., Crofton, K.M.,
1128 Hornung, M.W., 2013. Cross-species analysis of thyroperoxidase inhibition by
1129 xenobiotics demonstrates conservation of response between pig and rat. *Toxicology*
1130 312, 97–107. doi:10.1016/j.tox.2013.08.006

1131 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Crofton, K.M., Hornung, M.W., Simmons, S.O., 2014a.
1132 Development of Medium-Throughput Thyroperoxidase (TPO) Inhibition Assays for
1133 Screening, in: *Innovative Research for a Sustainable Future*. p. 4.

1134 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014.
1135 Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening.
1136 *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–399. doi:10.1021/tx400310w

1137 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014b.
1138 Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening.
1139 *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–99. doi:10.1021/tx400310w

1140 Pesce, L., Bizhanova, A., Caraballo, J.C., Westphal, W., Butti, M.L., Comellas, A., Kopp, P.,
1141 2012. TSH regulates pendrin membrane abundance and enhances iodide efflux in
1142 thyroid cells. *Endocrinology* 153, 512–521. doi:en.2011-1548 [pii] 10.1210/en.2011-
1143 1548

1144 Pickford, D.B., 2010. Screening chemicals for thyroid-disrupting activity: A critical comparison
1145 of mammalian and amphibian models. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 845–92.
1146 doi:10.3109/10408444.2010.494250

- 1147 Pitsiavas, V., Smerdely, P., Boyages, S.C., 1999. Amiodarone compared with iodine exhibits a
1148 potent and persistent inhibitory effect on TSH-stimulated cAMP production in vitro : a
1149 possible mechanism to explain amiodarone-induced hypothyroidism 241–249.
- 1150 Qatanani, M., Zhang, J., Moore, D.D., 2005. Role of the constitutive androstane receptor in
1151 xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995–1002.
1152 doi:en.2004-1350 [pii]10.1210/en.2004-1350
- 1153 Radvila, A., Roost, R., Burgi, H., Kohler, H., Studer, H., 1976. Inhibition of thyroglobulin
1154 biosynthesis and degradation by excess iodide. Synergism with lithium. *Acta Endocrinol.*
1155 (Copenh). 81, 495–506.
- 1156 Rajkovic, V., Matavulj, M., Johansson, O., 2010. Studies on the synergistic effects of
1157 extremely low-frequency magnetic fields and the endocrine-disrupting compound
1158 atrazine on the thyroid gland. *Int J Radiat Biol* 86, 1050–1060.
1159 doi:10.3109/09553002.2010.501837
- 1160 Raldúa, D., Babin, P.J., 2009. Simple, Rapid Zebrafish Larva Bioassay for Assessing the
1161 Potential of Chemical Pollutants and Drugs to Disrupt Thyroid Gland Function. *Environ.*
1162 *Sci. Technol.* 43, 6844–6850. doi:10.1021/es9012454
- 1163 Raldúa, D., Thienpont, B., Babin, P.J., 2012. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative
1164 system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis
1165 and function. *Reprod. Toxicol.* 33, 188–197. doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.001
- 1166 Rao, M.S., Reddy, J.K., 1987. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis.
1167 *Carcinogenesis* 8, 631–6.
- 1168 Renko, K., Hoefig, C.S., Hiller, F., Schomburg, L., Köhrle, J., 2012. Identification of iopanoic
1169 acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay.
1170 *Endocrinology* 153, 2506–13. doi:10.1210/en.2011-1863
- 1171 Ri, F., Kerchner, G., Persing, R., Ri, B., 1978. Dietary subacute toxicity of ethylene thiourea in
1172 the laboratory rat . PubMed Commons 2014.
- 1173 Richardson, V.M., Staskal, D.F., Ross, D.G., Diliberto, J.J., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S., 2008.
1174 Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major
1175 polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 244–50.
1176 doi:10.1016/j.taap.2007.09.015
- 1177 Ronco, A.M., Urrutia, M., Montenegro, M., Llanos, M.N., 2009. Cadmium exposure during
1178 pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids.
1179 *Toxicol. Lett.* 188, 186–91. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.008
- 1180 Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M.,
1181 Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose
1182 tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–7.
- 1183 Rouquié, D., Tinwell, H., Blanck, O., Schorsch, F., Geter, D., Wason, S., Bars, R., 2014. Thyroid
1184 tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of
1185 hepatic CAR / PXR nuclear receptors. doi:10.1016/j.yrtph.2014.10.003

1186 Ruiz-Llorente, S., de Pau, E.C., Sastre-Perona, A., Montero-Conde, C., Gómez-López, G.,
 1187 Fagin, J. a, Valencia, A., Pisano, D.G., Santisteban, P., 2012. Genome-wide analysis of
 1188 Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* 13, 147.
 1189 doi:10.1186/1471-2164-13-147

1190 Santini, F., Vitti, P., Ceccarini, G., Mammoli, C., Rosellini, V., Pelosini, C., Marsili, A.,
 1191 Tonacchera, M., Agretti, P., Santoni, T., Chiovato, L., Pinchera, A., 2003. In vitro assay of
 1192 thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol*
 1193 Invest 26, 950–955. doi:5514 [pii]

1194 Schmutzler, C., Bacinski, A., Gotthardt, I., Huhne, K., Ambrugger, P., Klammer, H., Schlecht,
 1195 C., Hoang-Vu, C., Gruters, A., Wuttke, W., Jarry, H., Kohrle, J., 2007. The ultraviolet filter
 1196 benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro
 1197 inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148, 2835–2844.
 1198 doi:en.2006-1280 [pii]10.1210/en.2006-1280

1199 Schmutzler, C., Gotthardt, I., Hofmann, P.J., Radovic, B., Kovacs, G., Stemmler, L., Nobis, I.,
 1200 Bacinski, A., Mentrup, B., Ambrugger, P., Grüters, A., Malendowicz, L.K., Christoffel, J.,
 1201 Jarry, H., Seidlovà-wuttke, D., Wuttke, W., Köhrle, J., 2007. Monograph Endocrine
 1202 Disruptors and the Thyroid Gland — A Combined in Vitro and in Vivo Analysis of
 1203 Potential New Biomarkers 115, 77–83. doi:10.1289/ehp.9369

1204 Schuur, A.G., van Leeuwen-Bol, I., Jong, W.M., Bergman, A., Coughtrie, M.W., Brouwer, A.,
 1205 Visser, T.J., 1998. In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by
 1206 polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics. *Toxicol. Sci.* 45, 188–
 1207 94. doi:10.1006/toxs.1998.2504

1208 Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., Braun, D., 2014. Structure and function of thyroid
 1209 hormone plasma membrane transporters. *Eur. Thyroid J.* 3, 143–53.
 1210 doi:10.1159/000367858

1211 Serrano-Nascimento, C., Calil-Silveira, J., Goulart-Silva, F., Nunes, M.T., 2012. New insights
 1212 about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide
 1213 symporter (NIS) expression in PCCl3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 154–161.
 1214 doi:10.1016/j.mce.2011.09.036

1215 Shankar, K., Liu, X., Singhal, R., Chen, J.-R., Nagarajan, S., Badger, T.M., Ronis, M.J.J., 2008.
 1216 Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated
 1217 with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1).
 1218 *Endocrinology* 149, 1748–56. doi:10.1210/en.2007-0903

1219 Shelby, M.K., Klaassen, C.D., 2006. Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and
 1220 duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional
 1221 pathways. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1772–1778. doi:10.1124/dmd.106.010397

1222 Shen, O., Du, G., Sun, H., Wu, W., Jiang, Y., Song, L., Wang, X., 2009. Comparison of in vitro
 1223 hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays. *Toxicol. Lett.* 191,
 1224 9–14. doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.019

- 1225 Singh, B., Dhawan, D., Chand, B., 1994. Biokinetics of Iodine- 131 in Rat Thyroid Following
1226 Lead and Lithium Supplementation 287–293.
- 1227 Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome:
1228 an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum.*
1229 *Reprod.* 16, 972–8.
- 1230 Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A., Cederroth, C.R., Combescure, C., Nef, S., Aubert,
1231 M.L., Hüppi, P.S., 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in
1232 the rat. *Environ. Health Perspect.* 117, 1549–55. doi:10.1289/ehp.11342
- 1233 Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Fisher, J.S., Leffers, H., Rajpert-de Meyts, E., Skakkebaek,
1234 N.E., 2004. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ
1235 testis and the testicular dysgenesis syndrome? *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 88, 144–51.
- 1236 St Germain, D.L., 1988. Dual mechanisms of regulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase
1237 in the rat kidney, liver, and thyroid gland. Implications for the treatment of
1238 hyperthyroidism with radiographic contrast agents. *J. Clin. Invest.* 81, 1476–1484.
- 1239 St Germain, D.L., Galton, V.A., Hernandez, A., 2009. Minireview: Defining the roles of the
1240 iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150, 1097–
1241 107. doi:10.1210/en.2008-1588
- 1242 Stoker, T.E., Ferrell, J.M., Laws, S.C., Cooper, R.L., Buckalew, a., 2006. Evaluation of
1243 ammonium perchlorate in the endocrine disruptor screening and testing program's
1244 male pubertal protocol: Ability to detect effects on thyroid endpoints. *Toxicology* 228,
1245 58–65. doi:10.1016/j.tox.2006.08.026
- 1246 Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L., 2002. The effects of atrazine metabolites
1247 on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 67, 198–206.
- 1248 Stump, D.G., O'Connor, J.C., Lewis, J.M., Marty, M.S., 2014. Key Lessons from Performance of
1249 the U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 Male and Female
1250 Pubertal Assays. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 101, 43–62.
1251 doi:10.1002/bdrb.21097
- 1252 Sun, H., Shen, O.-X., Xu, X.-L., Song, L., Wang, X.-R., 2008. Carbaryl, 1-naphthol and 2-
1253 naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro.
1254 *Toxicology* 249, 238–42. doi:10.1016/j.tox.2008.05.008
- 1255 Susarla, R., Gonzalez, A.M., Watkinson, J.C., Eggo, M.C., 1992. Expression of receptors for
1256 VEGFs on normal human thyroid follicular cells and their role in follicle formation. *J Cell*
1257 *Physiol* 227, 1992–2002. doi:10.1002/jcp.22930
- 1258 Suvorov, A., Girard, S., Lachapelle, S., Abdelouahab, N., Sebire, G., Takser, L., 2009. Perinatal
1259 exposure to low-dose BDE-47, an emergent environmental contaminant, causes
1260 hyperactivity in rat offspring. *Neonatology* 95, 203–209. doi:10.1159/000155651
- 1261 Suzuki, K., Lavaroni, S., Mori, a, Ohta, M., Saito, J., Pietrarelli, M., Singer, D.S., Kimura, S.,
1262 Katoh, R., Kawaoi, a, Kohn, L.D., 1998. Autoregulation of thyroid-specific gene
1263 transcription by thyroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8251–8256.

doi:10.1073/pnas.95.14.8251

Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M., 2006. Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with beta-estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci* 97, 25–31. doi:CAS [pii]10.1111/j.1349-7006.2005.00132.x

Temple, R., Berman, M., Robbins, J., Wolff, J., 1972. The Use of Lithium the Treatment of Thyrotoxicosis 274.

Tong, Z., Li, H., Goljer, I., McConnell, O., Chandrasekaran, A., 2007. In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* 35, 2203–2210. doi:10.1124/dmd.107.016972

Trachtenberg, J., Zadra, J., 1988. Steroid synthesis inhibition by ketoconazole: sites of action. *Clin. Invest. Med.* 11, 1–5.

Tsujio, M., Watahiki, Y., Yoshioka, K., Mutoh, K., 2007. Morphology of thyroid follicular cells of methimazole-treated rats. *Anat Histol Embryol* 36, 290–294. doi:AHE764 [pii]10.1111/j.1439-0264.2007.00764.x

Uchaipichat, V., Mackenzie, P.I., Guo, X.H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J.B., Miners, J.O., 2004. Human UDP-glucuronosyltransferases: Isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab. Dispos.* 32, 413–423. doi:10.1124/dmd.32.4.413

Uyttersprot, N., Costagliola, S., Dumont, J.E., Miot, F., 1999. Requirement for cAMP-response element (CRE) binding protein/CRE modulator transcription factors in thyrotropin-induced proliferation of dog thyroid cells in primary culture. *Eur. J. Biochem.* 259, 370–8.

Uzumcu, M., Kuhn, P.E., Marano, J.E., Armenti, A.E., Passantino, L., 2006. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 191, 549–58. doi:10.1677/joe.1.06592

van Beeren, H.C., Bakker, O., Wiersinga, W.M., 1995. Desethylamiodarone is a competitive inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone α -receptor protein. *Mol Cell Endocrinol* 112, 15 – 19.

van Beeren, H.C., Kwakkel, J., Ackermans, M.T., Wiersinga, W.M., Fliers, E., Boelen, A., 2012. Action of specific thyroid hormone receptor α (1) and β (1) antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat. *Thyroid* 22, 1275–82. doi:10.1089/thy.2012.0135

Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci.*

- 1303 Technol. 42, 5814–20.
- 1304 Vansell, N.R., 2002. Effect of Microsomal Enzyme Inducers on the Biliary Excretion of
1305 Triiodothyronine (T3) and Its Metabolites. *Toxicol. Sci.* 65, 184–191.
1306 doi:10.1093/toxsci/65.2.184
- 1307 Vansell, N.R., Klaassen, C.D., 2002. Increase in rat liver udp-glucuronosyltransferase mRNA
1308 by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug*
1309 *Metab. Dispos.* 30, 240–246. doi:10.1124/dmd.30.3.240
- 1310 Visser, T.J., 2000. Cellular Uptake of Thyroid Hormones, in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P.,
1311 Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., McLachlan, R., New,
1312 M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O. (Eds.), . South Dartmouth (MA).
- 1313 Walters, K.A., Simanainen, U., Handelsman, D.J., 2010. Molecular insights into androgen
1314 actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout
1315 models. *Hum. Reprod. Update* 16, 543–58. doi:10.1093/humupd/dmq003
- 1316 Waltz, F., Pillette, L., Ambroise, Y., 2010. A nonradioactive iodide uptake assay for sodium
1317 iodide symporter function. *Anal. Biochem.* 396, 91–5. doi:10.1016/j.ab.2009.08.038
- 1318 Wang, F., Zhang, Q., Zhang, X., Luo, S., Ye, D., Guo, Y., Chen, S., Huang, Y., 2014.
1319 Preeclampsia induced by cadmium in rats is related to abnormal local glucocorticoid
1320 synthesis in placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 77. doi:10.1186/1477-7827-12-77
- 1321 Wang, Y.-X., Lee, C.-H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., Evans, R.M., 2003. Peroxisome-
1322 proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*
1323 113, 159–70.
- 1324 Watkins, J.B., Klaassen, C.D., 1982. Induction of UDP-glucuronosyltransferase activities in
1325 Gunn, heterozygous, and Wistar rat livers by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *Drug*
1326 *Metab Dispos* 10, 590–594.
- 1327 Webb, P., Nguyen, N.-H., Chiellini, G., Yoshihara, H.A.I., Cunha Lima, S.T., Apriletti, J.W.,
1328 Ribeiro, R.C.J., Marimuthu, A., West, B.L., Goede, P., Mellstrom, K., Nilsson, S., Kushner,
1329 P.J., Fletterick, R.J., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., 2002. Design of thyroid hormone receptor
1330 antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 59–73.
- 1331 Weiss, J.M., Andersson, P.L., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., van Leeuwen, S.P.J., Hamers,
1332 T., 2009. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid
1333 hormone transport protein transthyretin. *Toxicol. Sci.* 109, 206–16.
1334 doi:10.1093/toxsci/kfp055
- 1335 Westholm, D.E., Stenehjem, D.D., Rumbley, J.N., Drewes, L.R., Anderson, G.W., 2009.
1336 Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated
1337 thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs.
1338 *Endocrinology* 150, 1025–32. doi:10.1210/en.2008-0188
- 1339 Wilson, M.R., 2009. The Endocrine System: Hormones, Growth, and Development. The
1340 Rosen Publishing Group.

1341 Wolff, J., 1998. Perchlorate and the Thyroid Gland. *Pharmacol. Rev.* 50, 89–105.

1342 Wolff, J., Chaikoff, I.L., 1948. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid
1343 function. *J. Biol. Chem.* 174, 555–564.

1344 Wu, B., Li, S., Dong, D., 2013. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic
1345 receptors CAR, PXR and VDR. *Drug Discov. Today* 18, 574–81.
1346 doi:10.1016/j.drudis.2013.01.001

1347 Wu, F., Zhou, X., Zhang, R., Pan, M., Peng, K.L., 2012. The effects of ammonium perchlorate
1348 on thyroid homeostasis and thyroid-specific gene expression in rat. *Environ. Toxicol.* 27,
1349 445–452. doi:10.1002/tox.20655

1350 You, S.H., Gauger, K.J., Bansal, R., Zoeller, R.T., 2006. 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct
1351 thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257-258, 26–34.
1352 doi:S0303-7207(06)00325-X [pii]10.1016/j.mce.2006.06.009 [doi]

1353 Yu, K.O., Narayanan, L., Mattie, D.R., Godfrey, R.J., Todd, P.N., Sterner, T.R., Mahle, D.A.,
1354 Lumpkin, M.H., Fisher, J.W., 2002. The pharmacokinetics of perchlorate and its effect on
1355 the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 182,
1356 148–159. doi:S0041008X02994329 [pii]

1357 Zhang, H.F., Lin, X.H., Yang, H., Zhou, L.C., Guo, Y.L., Barnett, J. V, Guo, Z.M., 2012. Regulation
1358 of the activity and expression of aryl hydrocarbon receptor by ethanol in mouse hepatic
1359 stellate cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 1873–81. doi:10.1111/j.1530-
1360 0277.2012.01787.x

1361 Zhang, N., Chu, E.S.H., Zhang, J., Li, X., Liang, Q., Chen, J., Chen, M., Teoh, N., Farrell, G.,
1362 Sung, J.J.Y., Yu, J., 2014. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits
1363 hepatocarcinogenesis through mediating NF-κB signaling pathway. *Oncotarget* 5, 8330–
1364 40.

1365 Zhou, T., Ross, D.G., Devito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure
1366 to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities
1367 in weanling rats. *Toxicol. Sci.* 61, 76–82. doi:10.1093/toxsci/61.1.76

1368 Zhou, X., 2010. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from
1369 global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *J. Androl.* 31, 235–43.
1370 doi:10.2164/jandrol.109.009266

1371 Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that
1372 acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and
1373 alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–
1374 612. doi:en.2004-1018 [pii]10.1210/en.2004-1018 [doi]

1375 Zoeller, R.T., Tan, S.W., 2007. Implications of research on assays to characterize thyroid
1376 toxicants. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 195–210. doi:10.1080/10408440601123578

1377 Zoeller, R.T., Tyl, R.W., Tan, S.W., 2007. Current and potential rodent screens and tests for
1378 thyroid toxicants. *Crit Rev Toxicol* 37, 55–95. doi:770421600
1379 [pii]10.1080/10408440601123461 [doi]

- 1380 Zoeller, T.R., 2010. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm.* 9, 28–40.
- 1381 Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E.,
1382 2009. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats.
1383 *Toxicol Sci* 107, 56–64. doi:kfn225 [pii]10.1093/toxsci/kfn225
- 1384

ARTICLE 2

Article en cours de révision, proposition prévue pour publication à la revue
"Toxicology in vitro"

VI. Screening thyroid toxicity using gene expression in the PCCL3 rat thyroid cell line

Authors

C.Dallot, O.Blanck, C.Hilmi, H.Tinwell, R.Bars, C.Risso-De Faverney

Keywords

Screening, Tier I battery, PCCL3, rat, endocrine disruption, thyroid, Propylthiouracil, Methimazole, Sodium Iodide, Perchlorate, Iprodione, Atrazine, Cefuroxime, toxicology.

Abstract

Whereas disruption of thyroid hormone signaling by environmental chemicals is a growing concern, identifying thyroid toxicants and determining their modes of action (MOAs) in early screening studies remains a challenge. In this context, we explored therefore the toxicological relevance of a 24 hours in vitro assay using the PCCL3 rat thyroid cell line specifically for identifying and detecting direct-acting thyroid toxicants. We characterized appropriate cell culture conditions for screening of thyroid toxicity using transcriptional profiles. It is noteworthy that PCCL3 cells were morphologically stable regardless of the culture time and the total number of cell passages; nevertheless, the

relative basal transcriptional expression of the selected genes was dependent of the number of cell passages from thawing.

Exposure of PCCL3 cells for 24 hours to known thyroid toxicants (10^{-3} M Propylthiouracil; Methimazole; Sodium Iodide; or Sodium Perchlorate) up-regulated the transcriptional profiles of a selection of genes involved in thyroid hormone synthesis or in the thyroid cell proliferation, such as Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1, and Gtse1, compared to vehicle control. In contrast, a similar exposure of cells to compounds having no known effect on the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid (HPT) axis did not affect the expression of the set of genes (10^{-3} M Cefuroxime), or down-regulated the transcriptional expression of some these genes (10^{-5} M Iprodione, or 10^{-4} M Atrazine).

Through this work, we have established the proof of a concept that discriminates direct-acting thyroid toxicants from compounds that do not affect thyroid function, on the basis of up-regulated expression of a set of genes, as criteria of positivity in the early screening in vitro assay based on PCCL3 rat thyroid cells.

A. Introduction

Early *in vitro* screening tests are essential to identify critical toxicity properties of molecules candidate for development as early as possible after the discovery of their biological interest. The results from *in vitro* screening tests provide an advanced toxicity warning, leading to complementary investigations in order to provide additional information on the toxicity profile of substances and to exclude definitively those which are not suitable for commercialization. These *in vitro* tests are ideally rapid, cheap and easy to perform for a

41 routine use. In most screening studies, *in vitro* bioassays are preferred to limit the use of test
42 animals.

43 Among all the toxic properties that have to be screened, there is increasing concern
44 about endocrine disruption. If the focus was initially put on sexual hormone disruptors, there
45 was also a growing need to better identify environmental chemicals that can exert adverse
46 effects on thyroid. Thyroid hormone disruption is complex and can be caused by the
47 disruption of many different mechanisms, including the Thyroid Hormone (TH) synthesis *via*
48 different molecular initiative events (MIE) (e.g. thyroperoxidase (TPO) or Sodium-Iodide
49 symporter (NIS) inhibition) (Boas et al., 2006; Crofton, 2008, Capen, 1994).

50 OECD recently reviewed available *in vitro* or *ex vivo* screening assays which could
51 target the different MIE (OECD, 2014). Before the validation of a standardized assay by
52 OECD, the criterion for assessing the readiness level of this test has to be taken into
53 consideration. Among different mechanisms to consider, perturbation of hormonal synthesis
54 by the inhibition of the thyroperoxydase (TPO) or of the Sodium/Iodine Symporter (NIS) can
55 be assessed by assays, potentially eligible for the long-term validation. Two other types of
56 assays integrating several mode of action (MoA) could be also considered as potentially
57 eligible for the long-term validation, such as the Zebrafish Eleutheroembryo Thyroid Assay
58 and the thyroid gland explant cultures. These two latter assays can measure by Radio
59 Immuno Assay the quantity of thyroid hormones produced by the biological model,
60 regardless the MoA of the molecule studied. They are only used to perform pre-screening
61 low-throughput assays.

62 The purpose of the present study was to explore the toxicological relevance of an
63 early screen based on an *in vitro* assay using the PCCL3 rat thyroid cell line, for specifically
64 detecting the direct-thyroid-disrupting compounds, targeting the MIE relative to the thyroid
65 hormone synthesis. In this context, the PCCL3 culture conditions needed to be optimized
66 (e.g. the passage number of cells, TSH concentration in the culture medium) in order to
67 validate the relevance of this cell line as cell model for *in vitro* assay. Therefore, cells were
68 exposed 24 to 72 hours to four known thyroid toxicants, such as Propylthiouracil (PTU),
69 Methimazole (MMI), iodine in excess (administered as Sodium Iodide, NaI), and Sodium
70 Perchlorate (NaClO₄); and to three compounds having no known toxic effect on the thyroid,
71 such as Iprodione (IPR), Atrazine (ATZ) and Cefuroxime (CEF). Main mechanisms of action
72 and toxic effects of each compound on thyroid regulation are summarized in table 1.

Chemicals	Thyroid regulation target / known toxicity target	Effect on thyroid regulation / main toxic effect	References
Perchlorate (sodium perchlorate, NaClO₄-)	NIS-mediated iodide uptake	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Merrill et al., 2003; Yu et al., 2002)
Methimazole (MMI)	TPO inhibition	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Leoni et al., 2011; Katie B Paul et al., 2014a)
Propylthioureia (PTU)	TPO inhibition	Decreased thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃	(Leoni et al., 2011; Katie B Paul et al., 2014a)
	Inhibition of deiodinase 1 activity	Decreased peripheral conversion of T ₄ into T ₃	(Ortega et al., 1996)
Excess of Iodine (Sodium Iodide, NaI)	Release of free iodide in blood stream: transient TPO inhibition	Thyroidal synthesis of T ₄ and T ₃ transiently decreased (Wolff-Chaikoff effect)	(Wolff and Chaikoff, 1948)
	Proteolysis of active hormone from the colloid	Decreased thyroid hormone secretion	(Capen, 1994)
Atrazine	No potential for thyroid disruption Sexual hormone disruptor: GnRH signaling	No potential for thyroid disruption Decreased male and female gamete production	(Stoker et al., 2002) (Laws et al., 2000)
Iprodione	No potential for thyroid disruption Sexual hormone disruptor	No potential for thyroid disruption Sex hormone biosynthesis inhibited	(Unpublished data, no entry for « thyroid + Iprodione » in Pubmed)
Cefuroxime	No potential for thyroid disruption		(Blystone et al., 2007)

The objective of the present study was to establish the expression profiles of a set of six genes (as seen in Table 2) from PCCl3 cells following the different chemical treatments. The selected candidate genes are involved in direct regulation of thyroid hormone synthesis, in cell cycle regulation/ cell death / cell proliferation / tumor genesis or encoding for a tumor marker, and in cell signaling. Changes in mRNA levels were measured using qRT-PCR. Several *in vitro* and *in vivo* studies showed changes in transcript levels of many genes in rat thyroid follicular cells after administration of THDCs (Gentilcore et al., 2013; Giuliani et al., 2014; Glatt et al., 2005; Hard, 1998; Leoni et al., 2011, 2008; Mcdougal et al., 2011). For our investigations relative to gene expression profiles, PCCl3 cell line is probably one of the most relevant cell model since it has been already used in several works to study induction and repression of thyroid-specific gene expression in different conditions (Andrade et al., 2011; Fernández et al., 2014; Leoni et al., 2008; Ruiz-Llorente et al., 2012). The relevance of these gene expression profiles as early biomarkers of thyroid hormone signaling disruption was assessed.

Gene Product	Gene	Taqman gene expression assay ID	RefSeq	Biomarker Group
Thyroid peroxidase	Tpo	Rn00571159_m1	NM_019353.1	Direct regulation of thyroid hormone Synthesis
Thyroglobulin	Tg	Rn00578496_m1	NM_030988.1	
Dual oxidase 1	Duox1	Rn00596688_m1	NM_153739.1	
Pituitary tumor-transforming 1	Pttg1	Rn00574373_m1	NM_022391.2	Cell cycle regulation / cell death / cell proliferation / tumor genesis / tumor marker
G-2 and S-phase expressed 1	Gtse1	Rn01506033_m1	NM_001130500.1	
Notch 1	Notch1	Rn01758633_m1	NM_001105721.1	Cell Signaling (upstream modulation of thyroid specific gene expression)

89

90 B. Materials and Methods

91 1. Cell culture and treatment.

92 PCCl3 (rat follicular cells, generously provided by Pr. Alfredo Fusco, Centro di
93 Endocrinologia e Oncologia Sperimentale di C.N.R Naples, Italy), which were grown in 6H5
94 medium, consisting of Coon’s modified F-12 medium supplemented with 5% FBS, 2 mM l-
95 Glutamine, and a mixture of six hormones: 1 nM TSH, 10 µg/mL insulin, 10 ng/mL somatostatin,
96 5 µg/mL transferrin, 10 nM hydrocortisone, and 10 ng/mL glycyl-l-histidyl-l-lysine acetate. This
97 cell culture medium is considered as a standard cell culture medium containing specifically a
98 mixture of six hormones, in particular 1nM TSH.

99 Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. They
100 were harvested at 80–90% confluence five days post seeding. The absence of mycoplasma
101 contamination was regularly checked using Mycoalert™ mycoplasma detection kit (Lonza).

102 Our investigations involved to test the influence of cell passage number (e.g. passages 0 to 67)
103 from thawing, and different TSH concentrations (0, 40, 200, 1000, or 2000 mUI/L) on PCCl3 cells
104 in culture, through morphological and functional observations.

105 Cell morphology was monitored using phase-contrast microscopy, 24h, 48h, 72h, and 96h after
106 cell seeding, from passage 0 to 67 after being received by our laboratory, cells being frozen
107 every 15 passages.

108 As appropriate for the experiments to be performed, cell cultures at passages 2 and 7 after
109 being defrost were washed with PBS and then starved in serum-free medium overnight, before
110 they were treated with different concentrations of bovine TSH (TSH, Sigma, T8931) at 0, 40,
111 200, 1000, or 2000 mUI/L, for 72h. Even if not documented, PCCl3 cells are reputed not to be
112 totally functional immediately after thawing. Two passages after thawing are often considered
113 as mandatory for the cells to be used in gene expression experiments, therefore we assessed
114 the relevance of the use of the PCCl3 cells in such conditions. Using the cells around seven
115 passages after thawing are considered as the standard optimal conditions for PCCl3 cell
116 cultures. We arbitrary chose these cells in these conditions to be compared with the cells at
117 only two passages after thawing. In these two different experimental conditions, the basal level
118 of expression of six genes of interest were studied using a real-time quantitative reverse-
119 transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) approach (see below).

Methimazole (CAS 60-56-0), propylthiouracil (CAS 2954-52-1), sodium perchlorate (CAS 7601-89-0), and sodium Iodide (CAS 7681-82-5), are used to study the effect of thyroid toxicants on PCCL3 cells, and cefuroxime (CAS 55268-75-2), iprodione (CAS 36734-19-7), and atrazine (CAS 1912-24-9), to study the effect of chemicals having no known toxicity against the thyroid. All these chemicals used in the present study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France) and were of the highest quality available from commercial sources. Each compound was dissolved in DMSO and used at a final concentration of 10^{-3} M for PTU, MMI, NaI, NaClO₄, and CEF, 10^{-4} M for ATZ, and 10^{-5} M for IPR. These concentrations were the highest possible considering cytotoxicity and solubility of each test compound.

Cell cultures were treated with each compound for 24 or 72 hours. Cell medium was changed daily to ensure the constant concentration of the tested chemical compounds. DMSO concentration in the cell culture medium was 0.1 % (vol/vol) in control cell groups, exposed to DMSO only, and in other cell groups, treated with each chemical compound tested. A group of MOC (MOC, Medium Of Culture) cells, considered as an untreated-cell group cultured in a DMSO-free culture medium was used to assess the potential role of the vehicle regarding the observed changes in gene expression.

The XTT assay (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) was used for the quantification of the anti-proliferative or cytotoxic effects of the compounds at maximum concentration after 72h exposure. In the same experimental conditions, ATPLite™ (ATPLite™, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) was used to

investigate the cytostatic and proliferative effects of various substances. These two assays were carried out according to the manufacturer's instructions.

2. Gene transcript measurements.

Total RNA was isolated from cell culture lysate samples using RNeasy Mini kits (Qiagen, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The resulting total RNA was quantified using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA). RNA integrity (28S/18S ratio) and purity was assessed using RNA 6000 nano assay LabChips (Agilent Technologies, USA) and analyzed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Every samples tested had an RNA integrity number (RIN) >8.0 (Agilent software) and were therefore used for further analyses. A real-time quantitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) approach was used with the selected transcripts. cDNA was synthesized with 40 µg total RNA from each sample, through a reverse transcription with random hexamer primer using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was then pre-amplified for the endogenous control (B2m) and target genes as described elsewhere (Devonshire et al., 2011) using Taqman probes (Assay on demand; Applied Biosystems; RefSeq Summary in Table 2). RT-qPCR reactions were performed using the same Taqman probes, 1/20 pre-amplified complementary DNA, and FastStart Universal Probe Master Mix (Roche, Bâle, Switzerland) on a nanofluidic PCR system, the BioMark 48 × 48 dynamic arrays (Fluidigm, San Francisco, CA).

Assays were performed in three or six replicates, on separate plates for each treatment group. All gene expression levels were normalized to the corresponding B2m levels. B2m,

showing constant expression levels over all experimental conditions, was selected as the housekeeping gene. To determine the fold changes in gene expressions among different treatment groups, the normalized gene expression of the target genes in treated groups was divided by the normalized expression of the same target gene in the control groups. For fold-changes, the reference ratio value (obtained from control groups) is “1” and compared with the other ratio values calculated from treated groups.

3. Statistical analyses.

Data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) of at least three or six replicate measurements. Statistical analysis was performed according to Kennel et al. (2004) for gene transcript measurements, by using GraphPad software (version 6.05, GraphPad Software, Inc.). All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test to determine treatment effect and to compare differences between group means. Differences were considered to be significant at P-value < 0.05.

C. RESULTS

1. *The influence of passage number on the morphological development of PCCL3cells*

To study the influence of passage on the PCCL3 model, the cell cultures were monitored by phase-contrast microscopy 24h after seeding, from passage 0 to 67. Optical microscopy did not reveal any major morphological differences between the passages. As shown in figure 1, there was no change of cell size and shape between passage 0 and 67. From the initial batch given to our laboratory to constitute our cell bank to the experiments presented here, the cell growth rate, estimated by the time required by the cells to reach, from a constant spreading

concentration, a confluence state around 90% which requires cell passaging, remained constant over time (data not shown). Whereas the cell growth rate was progressively increased until passage 3 after thawing, cells between passages 3 and 15 were expanded until they reached approximately 80-90% confluency, with a relatively constant growth rate.

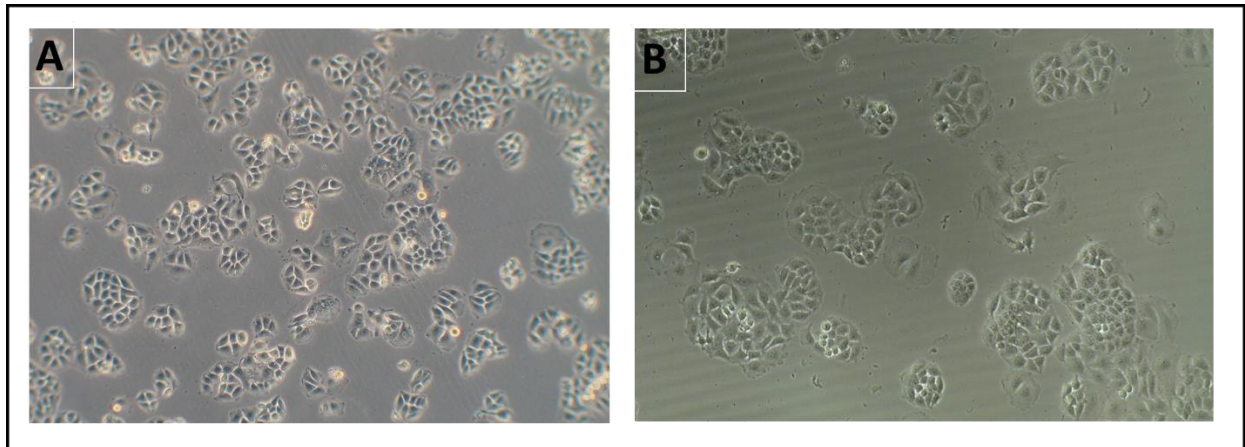


Figure VI-1. Morphological appearance of 24h-cultured PCCl3 cells observed under phase contrast microscopy. (x 50). (A) PCCl3 cells from the thawed initial batch, considered at "passage 0". (B) PCCl3 cells at passage 67.

Aging is known to affect morphology and functionality of cells in culture after an important number of passages in different cell lines. FRTL5 cells, which are very close to PCCl3 cells in terms of origin, morphology, and expression of thyrocyte differentiation markers (Fusco et al., 1987; Kimura et al., 2001), were described to lose their functional and morphological integrity after around 40 passages (Golstein et al., 1999). We have not provided any evidence of such alterations from our investigations on PCCl3 cells used with a high total passage number (e.g. at passage 67) from thawing.

2. The influence of cell passage number and TSH concentration added to cell culture medium, on mRNA levels of candidate genes (Fig.2)

a. Influence of the concentration of TSH in the culture medium

Tpo and Notch1 relative gene expression was lower in cells at passage 2 compared to in cells at passage 7, regardless the concentration of TSH in the culture media. On the opposite, relative expression was 1.4-fold, 1.2-fold, and 1.6-fold higher in cells at passage 2 than in cells at passage 7 for Tg, Pttg1, and Gtse1 respectively. We did not observe difference in Duox1 gene relative expression in cells at passage 2 compared to that in cells at passage 7.

b. Influence of the concentration of TSH in cell culture medium on the relative expression of the genes of interest

As shown previously, the influence of increasing TSH concentrations on the level of relative expression of Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1, and Gtse1 genes was similar for the cells at passage 7 compared to the cells at passage 2. In the former case, the level of relative expression of genes increased up to 200 mUI/L TSH and remained globally stable or slightly rising between 200 and 2000 mUI/L TSH, whereas in the second case the levels showed non-monotonic curves.

The level of relative expression of all selected genes seemed to be dependent of the TSH concentration present in the cell culture medium. In PCCl3 cultured without TSH, the expression level of genes reached less than half the level reached in cells cultured in the standard culture conditions, such as cells at passage 7 cultured in a medium containing 1000

217 mUI/L TSH. Only Duox1 relative expression was slightly affected by the variation in TSH
218 concentration, regardless the number of passages preceding the experiment.

219 In cells at passage 2, the increase in relative mRNA quantity observed for Tpo, Tg,
220 Notch1, Pttg1, and Gtse1 reached a plateau at only 40 mUI/L TSH. Relative mRNA quantity of all
221 the selected genes (Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1, and Gtse1) was decreased at 2000 mUI/L
222 compared to 1000 mUI/L TSH. In this group of cells, Tpo gene expression was increased 5-fold
223 between 0 and 40 mUI/L TSH, remained stable up to 1000 mUI/L TSH, and was decreased 0.2-
224 fold at 2000 mUI/L TSH. Tg gene expression was tripled between 0 and 40 mUI/L TSH, was
225 progressively decreased following the increase in TSH concentration. Compared to the
226 maximum level reached at 40 mUI/L TSH, Tg relative gene expression was decreased 0.7-fold
227 at 2000 mUI/L TSH. Duox1 gene expression was increased 1.25-fold between 0 and 40 and 1000
228 mUI/L TSH, and was comparable at 0 and at 2000 mUI/L TSH. Notch1 relative gene expression
229 reached a maximum at 40 mUI/L TSH. It represented 4.5-fold Notch1 relative gene expression
230 in absence of TSH, and twice the one at 2000 mUI/L. At 200 and 1000 mUI/L TSH, Notch1
231 relative gene expression was about 0.8-fold the one at 40 mUI/L TSH. Pttg1 relative gene
232 expression reached a plateau between 40 and 1000 mUI/L TSH which represented 2.4-fold the
233 one in the absence of TSH, and 1.5-fold the one at 2000mUI/L TSH. Gtse1 relative gene
234 expression was respectively 2-fold, 2.3-fold, 2.4-fold, and 1.3-fold more important at 40, 200,
235 1000, and 2000 mUI/L TSH compared to the one in the same cells cultured without TSH.

236 In cells at 7 passages, the relative expression of all the genes of the set increased from a
237 low level at 0 mUI/L TSH and reached a maximal level in presence of 200 mUI/L TSH in the cell

culture medium. Then the expression of these genes were maintained stable with the concentrations of TSH between 200 and 2000 mUI/L. The relative increase in relative gene expression between 0 mUI/L TSH and the plateau was about 100% for Tpo, Tg, Notch1, Pttg1, and Gtse1.

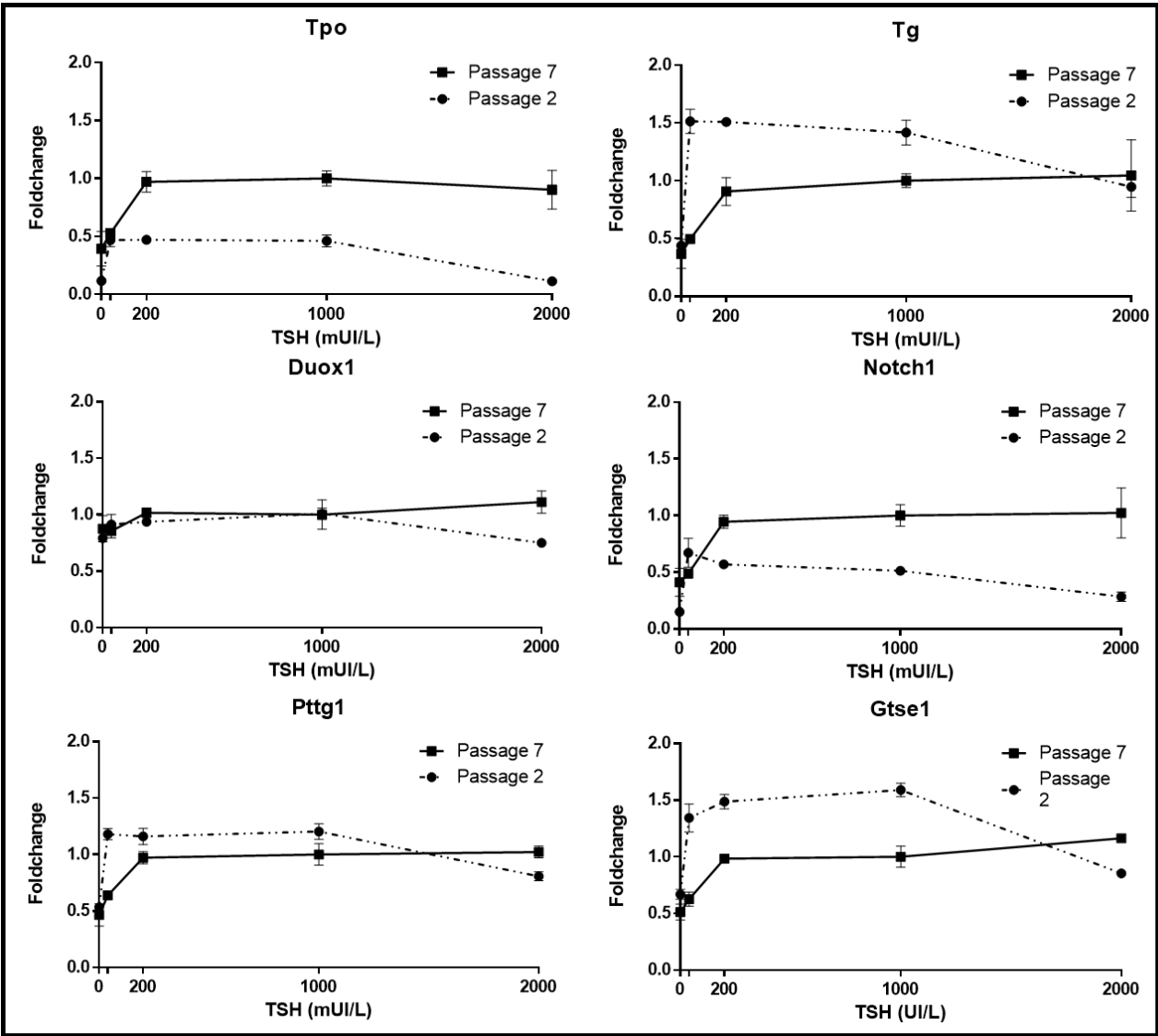


Fig.2. Effect of passage number and TSH concentration added in the cell culture medium on relative quantities of gene transcripts of Tyroperoxydase (Tpo), Thyroglobulin (Tg), Dual oxidase 1 (Duox1), Notch1, Pituitary tumor-transforming 1 (Pttg1), G-2 and S-phase expressed 1 (Gtse1) in PC13 cells after 72h. Results are presented as a relative fold change representing the ratio between the mean relative expression of each gene in the cells of interest and the one in cells at passage 7 and exposed to 1000 mUI/L TSH. Values are means \pm SD of 4 culture wells/data point.

248

249

3. Effects of 0.1% DMSO on mRNA levels of candidate genes after 72hours

250

251

252

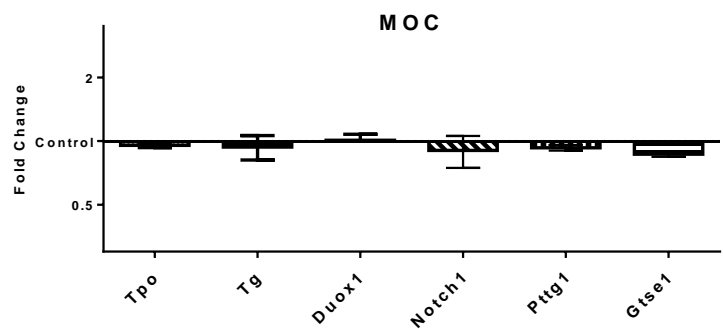
253

254

255

256

For screening hydrophobic compounds in toxicological studies, solvents like dimethylsulfoxide (DMSO) are inevitable. However, by using this solvent, the interpretation of test compound-induced responses can be biased. As shown in Figure 3, Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1 and Gtse1 gene expression in PCCl3 cells cultured as DMSO-free controls (i.e. untreated cell cultures, named MOC for Medium of Culture) was not different from in cells exposed to DMSO in the culture medium for 72h, at the final concentration (0.1%) used for the different treatments of cell cultures.



257

258

259

260

261

262

263

264

265

Figure VI-2. Relative expression of candidate genes (Tyroperoxydase (Tpo), Thyroglobulin (Tg), Dual oxidase 1 (Duox1), Notch1, Pituitary tumor-transforming 1 (Pttg1), G-2 and S-phase expressed 1 (Gtse1)) in PCCl3 cells cultured in DMSO-free medium, compared to in cells exposed for 72h to 0.1% DMSO (Exposure conditions) Results are presented as a relative fold change representing the ratio between the relative expression of each gene in cells cultured in DMSO-free medium and the one in control cells exposed to DMSO 0.1 % for 72h.. Data was obtained by real-time RT-PCR and is presented as Mean means \pm SD (n=3 to 6). Each gene expression was normalized to its respective DMSO control, which was always set to 1. A dotted line at expression level of 1 is shown for visual clarity.

4. Cytotoxic analysis of the tested chemical compounds.

The present study investigated the cytotoxic, cytostatic and anti-proliferative effects for each chemical compound at the relevant concentration used. None of all chemicals did induce any significant alteration after application of XTT and ATP-Lite assays (Data not shown).

5. Changes in the expression of a set of six genes were observed in PCCl3 cultures exposed for 24h to known thyroid toxicants (PTU, MMI, NaI, NaClO₄) and other compounds having no known thyroid-disrupting effect (IPR, ATZ and CEF).

In cells exposed for 24h to MMI, PTU, NaClO₄, or NaI, the expression of all candidate genes were significantly up-regulated. In contrast, no significant up-regulation was revealed by gene expression profiles from cell cultures treated with CEF, IPR, or ATZ.

Cell cultures treated with MMI and PTU for 72h had very close gene expression profiles, globally up-regulated. With these two treatments, transcript levels for Tpo, Tg, Duox1, Pttg1, and Gtse1 were significantly increased more than 1.3- to 2.1-fold compared to DMSO controls (DMSO-treated). Moreover, it is noticeable that the transcriptional up-regulation of Tpo gene was slightly lower than that of Tg, whereas for Pttg1 and Gtse1, the up-regulation was similar and reached 2-fold level of gene expression relative to DMSO controls. In both treated-cell groups, Duox1 expression was only around 1.4-fold up-regulated; Notch1 was the only gene of the set for which the transcriptional up-regulation level was the lowest. The only difference between the two gene expression profiles from MMI- and PTU-treated cells is the Notch1 expression, which was only significantly 1.4-fold up-regulated in cells exposed to MMI; in PTU-treated cells, the expression of this gene increased more than 1.2-fold but not significantly.

Exposure to NaClO₄ lead only to a significant 1.3- and 1.9-fold increase in the transcript levels of Tpo, and Notch1 respectively. NaI treatment induced significant increase in transcriptional expression of Tpo, Tg, Pttg1, and Gtse1, 1.9-, 1.6-, 2.0-, and 2.4-fold respectively.

291 None of the selected genes was deregulated in response to the exposure to CEF. After
292 exposure of PCCL3 to IPR, Tg and Notch1 transcript levels were significantly 0.5-fold reduced.
293 With ATZ treatment, a significant transcriptional down-regulation of Pttg1 and Gtse1 was
294 observed with a significant 0.7- and 0.6-fold decrease in the transcript levels respectively,
295 compared to DMSO controls.

296

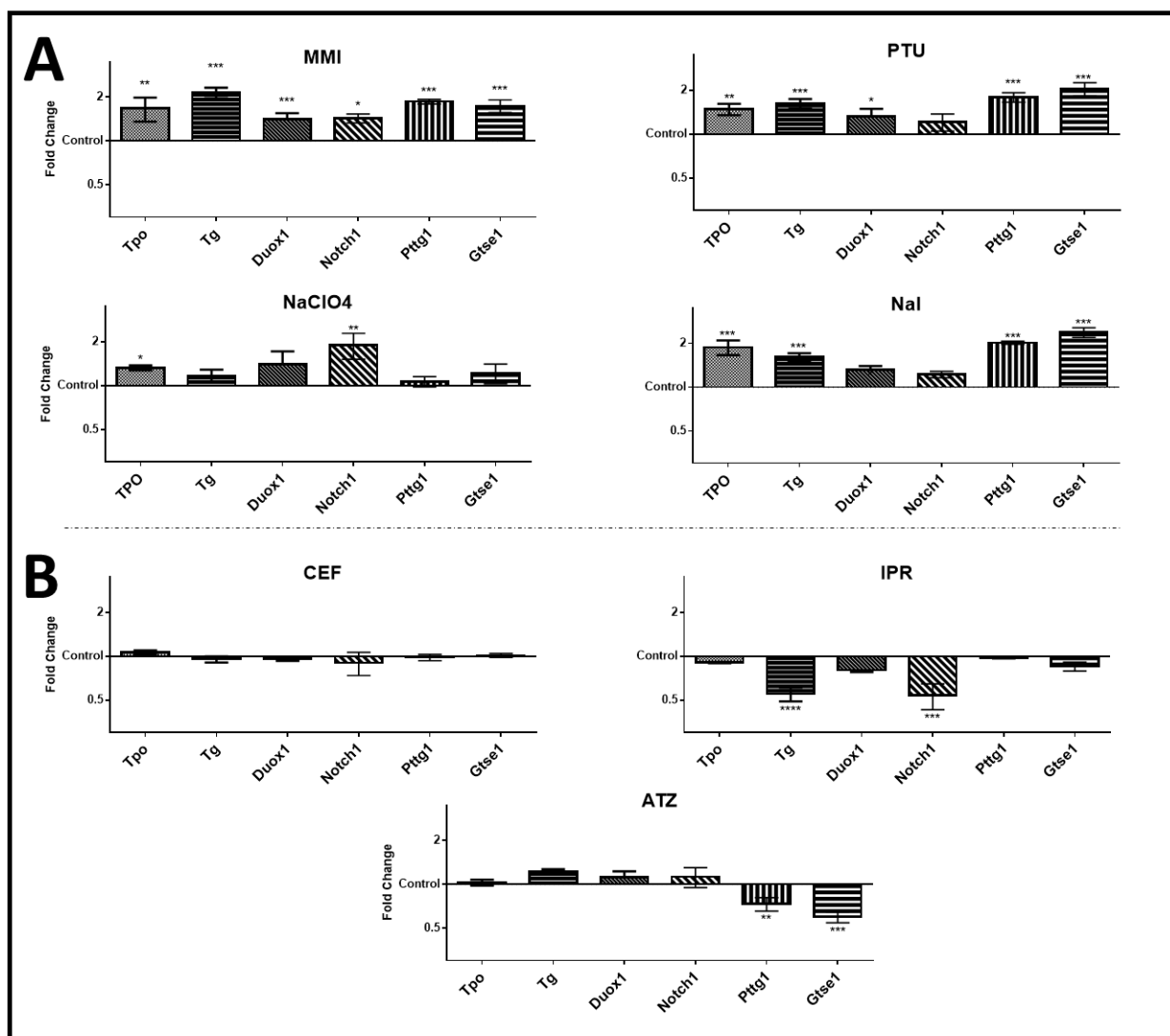


Figure VI-3 Effect of treatment on relative quantities of gene transcripts of Tyroperoxydase (Tpo), Thyroglobulin (Tg), Dual oxidase 1 (Duox1), Notch1, Pituitary tumor-transforming 1 (Pttg1), G-2 and S-phase expressed 1 (Gtse1) in cells exposed to Methimazole (MMI; 10-3 M), Propylthiouracil (PTU; 10-3 M), Sodium Perchlorate (NaClO4; 10-3 M), Sodium Iodide (NaI; 10-3 M), Cefuroxime (CEF; 10-3 M), Iprodione (IPR; 10-5 M), and Atrazine (ATZ; 10-4 M). Each gene expression was normalized to its respective DMSO control, which was always set to 1. A dotted line at expression level of 1 is shown for visual clarity. Data was obtained by real-time RT-PCR and is presented as means \pm SD of 3-6 culture wells/data point. A, compounds known to be thyroid toxicants. B, compounds having no effect on thyroid system. Deregulation profile of this selection of genes is different in cells treated with compounds having no effect on thyroid system from in cells treated with thyroid toxicants. *, significantly different from controls (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

D. Discussion

PCCL3 cell line has been used to study thyroid physiopathology. Indeed, it is the cell line that is the closest from rat primary thyroid follicular cells regarding their response to TSH (Kimura et al., 2001). It is also the only thyroid follicular cell line described to express pendrin (Calil-Silveira et al., 2012; Pesce et al., 2012), which is an important actor of thyroid hormone synthesis because it mediates the apical efflux of iodide from the thyrocyte to the follicle. From a toxicological point of view, expression of pendrin by PCCL3 plays a key role since this transporter is likely to be affected by the toxicity of perchlorate (Attanasio et al., 2011), competing with iodide at the sodium-iodide symporter (NIS). From an experimental point of view, PCCL3 cell line is used in many laboratories and therefore easily available, and its culture does not involve specialized or expensive facilities. However, in spite of the advantages of this rat thyroid cell line and the lack of an appropriate *in vitro* model for screening thyroid toxicants, integrating different modes of action, the PCCL3 cell line was not been assessed for a such use, to our knowledge.

There are a variety of mechanisms determining thyroid hormone balance or disruption directly or indirectly. In the present study, we used direct-acting agents such as MMI, PTU, Nal, and NaClO₄, which can cause changes in thyroxin synthesis and/or secretion in thyroid through effects on peroxidases, thyroidal iodide uptake, deiodinase, and proteolysis (Table 1). Because their potential to disrupt thyroid hormones has been identified as an important consideration for the regulation of chemicals, we have assessed whether the PCCL3 could be suitable for the use as an *in vitro* assay for screening and testing thyroid toxicants acting through different modes of action.

1. A selection of set of genes was selectively affected by treatment with thyroid-specific- and -nonspecific toxicants.

The overview of the overall gene expression profiles of PCCl3 cells exposed to different compounds is given by figure 4. Figure 4 shows up-regulated gene expression profiles in cells treated with thyroid-specific toxicants and then not affected or down-regulated gene expression profiles in cells exposed to CEF, IPR, or ATZ, considered as thyroid-nonspecific toxicants having no known thyroid-disrupting effect. Therefore, the measurement of transcript levels of six selected genes in PCCl3 cells exposed to chemicals allowed us to establish a difference between the gene expression profiles obtained from cells treated with thyroid-specific toxicants such as MMI, PTU, NaI, and NaClO₄, from cells treated with thyroid-nonspecific toxicants such as CEF, IPR, and ATZ.

The variation of transcriptional expression of Tpo or Tg by some chemical treatments may disrupt the thyroid hormone synthesis. Indeed, Tpo gene codes for the thyroid peroxidase, the enzyme of the apical membrane of the thyrocyte catalyzing the H₂O₂-dependant iodination of thyroglobulin. Tpo gene expression has been described to be down-regulated *in vivo* in rats after administration of a massive dose (520 mg/kg/d) of perchlorate for 90 days (Wu et al., 2012). The same tendency was observed *in vitro* in PCCl3 cells after 24h exposure to 10⁻³ M NaI (Leoni et al., 2008) and was therefore selected as a potential biomarker for thyroid hormone disruption. In contrast, our results demonstrated a significant increase of Tpo gene expression after 24h exposure to all the thyroid-specific toxicants tested (MMI, PTU, NaI, and NaClO₄). We could hypothesize that the difference between our results and those of Leoni et al. was due to the use of different cell culture media. Tpo is the only gene deregulated by all the thyroid

352 toxicants tested and unaffected by exposure to compounds having no known thyroid-disrupting
353 effect.

354 Second gene of the set, Tg, codes for the thyroglobulin, the protein precursor of the
355 thyroid hormones. It is synthesized in the thyrocyte, secreted into the lumen of the follicle to
356 be grafted with iodide and then reincorporated by endocytosis back in the thyrocyte. Tg
357 transcription regulation is complex, under the influence of (i) the thyroid transcription factors
358 as well as Tpo gene (Fernández et al. 2014; Ferretti et al. 2008), (ii) the autocrine mechanisms
359 (Suzuki et al., 1998), and (iii) xenobiotics (Giuliani et al., 2008; Wu et al., 2012). Tg gene
360 expression was increased in cells exposed to MMI, PTU, NaI, but not in cells exposed to NaClO₄.
361 Contrary to results shown by Leoni et al., our study demonstrated that Tg gene expression
362 decreased in PCCL3 cells exposed for 24h to 10⁻³ M NaI (Leoni et al., 2008). To explain these
363 opposite results, the same hypothesis as previously about the potential difference of cell
364 culture media can be provided. Nevertheless, some studies have shown that thyroid
365 transcription factors TTF1, TTF2, and Pax8 could modify the expression of thyroid-specific genes
366 Tpo and Tg ; thus it is likely that these transcription factors may regulate the toxic effects of
367 excess iodine (Fernández et al., 2014; Jahnke et al., 2004).

368 Expression of the gene encoding for dual oxidase 1, responsible of the H₂O₂ generation
369 in the follicle *in vivo*, was up-regulated only in cells exposed to compounds targeting TPO, such
370 as PTU and MMI. In the present study, the two compounds (PTU, MMI) shared the same
371 toxicological profile of gene expression related to the six genes selected (fig 4, A). Thus, it can

372 be hypothesized that a similar profile resulting from an exposure of PCCl₃ to an unknown
373 substance could provide a first relevant indication about its capacity to interact with TPO.

374 Notch1 gene codes for one of the proteins involved in cell signaling, leading to the
375 regulation of thyroid hormone synthesis through the transcription of genes essential for thyroid
376 differentiation and function, such as NIS, Tpo, or Tg (Carre et al., 2011; Ferretti et al., 2008).
377 Among the selected set of genes, Notch1 is far the most deregulated in cells exposed to NaClO₄.
378 To our knowledge, these original results do not find relevant comparison in the literature, and
379 would therefore constitute valuable reference data to explore a potential new toxic mode of
380 action of perchlorate on thyroid. Indeed, the interaction of perchlorate with Notch1-signalling
381 pathway could be consistent with results of Wu et al. (2012). Indeed, this team have identified
382 that in rats, perchlorate can affect some thyroid-specific gene (Tg and Tpo) expression
383 independently to the iodide uptake inhibition, and also the perturbations resulting in circulating
384 levels of thyroid hormones and TSH (Wu et al., 2012).

385 Two genes coding for proteins involved in the regulation of the cell cycle or in tumor
386 genesis, Pttg1 and Gtse1, are preferentially associated to the tumor genesis (Heaney et al.
387 2001; Monte et al. 2003), Treatment with MMI, PTU and AMT induces tumors in in rat in long
388 term studies (Takizawa et al. 2006; Hood et al. 1999; Tsujio et al. 2007; Ri et al. 1978; Hurley, et
389 al. 1998). As pro-proliferative genes, Pttg1 and Gtse1 were not surprisingly up-regulated in cells
390 exposed to MMI and PTU. Increase of relative gene expression in cells exposed to NaI is
391 however unexpected, since Leoni et al. (2008) found that comparable NaI treatment led to

decreased cell proliferation. It is to note that cytotoxicity testing did not reveal any change in PCCl3 cell proliferation after exposure to 10^{-3} M NaI (data not shown).

2. Characterization of cell culture condition for screening of thyroid toxicity

PCCl3 cell line is not reported to be particularly affected by aging as the FRTL5 rat thyroid cell line, which is very close to PCCl3 (Fusco et al., 1987), is (Golstein et al., 1999). Actually, PCCl3 are widely used in studies regardless the number of passages; it is hypothesized that the stability of the cell line is established on the basis of the morphological integrity through time. Here, we confirmed the stability of the morphology of the cells over a high number of passages. As the repeatability and reproducibility of the test was verified through the homogeneity of results (data not shown), we considered to have no particular reason to doubt about the stability of the PCCl3 cell line over time.

One essential characteristic of the PCCl3 cell line is its sensitivity to stimulation by TSH (Kimura et al., 2001), which is essential to accurately model behavior of thyroid in response to environmental changes, such as exposure to xenobiotics. At the final concentration of TSH corresponding to 200 mUI/L in the cell culture medium, PCCl3 had a very low proliferation rate. Moreover, as shown in Figure 3, the basal transcriptional expression of all the genes of interest reached very low levels in PCCl3 cultured in the presence of 200 mUI/L TSH whereas these basal expression levels were maintained stable with 1000 mUI/L TSH in the culture medium. This latter concentration was routinely used in standard conditions (Fusco et al., 1987; Kimura et al., 2001; Leoni et al., 2008; Serrano-Nascimento et al., 2012). 1000 mUI/L TSH was also considered

413 as an appropriate concentration to study variation of gene expression in PCCl3 cells exposed to
414 different xenobiotics.

415 If the total number of passages is not considered as an important issue when culturing
416 PCCl3 cells, working in stabilized culture conditions seems to be essential to study gene
417 expression in this cell line. In particular, increasing the number of cell passages before working
418 with the cell line appears to be required for the stabilization of gene expression. Thus, one of
419 the objectives of the present study was to optimizing the procedure to prepare PCCl3 cells in
420 order to obtain reliable and reproducible results with this cell model. The quality of PCCl3 cells
421 is dictated both by the number of cell passages chosen and the standardized composition of the
422 culture medium used. Fig.2 shows that cells at passage 2 and 7 had a different basal gene
423 expression. In cells at passage 2, the transcriptional expression of each gene increased with
424 increasing TSH concentrations to reach a stable level from 200 mUI/L TSH; then gene
425 expression levels decreased at the highest TSH concentration used (2000 mUI/L). In contrast,
426 cells at passage 7 showed an increase of gene expression levels with TSH concentration up to a
427 maximal level stable, with TSH concentrations between 200 and 2000 mUI/L. Thus, in the
428 present study, the basal gene expression levels were more stable in cells at passage 7 than the
429 ones in cells at passage 2, regarding the composition of the culture medium, in particular TSH
430 concentration. Therefore, in order to obtain a maximal basal gene expression level stable in
431 PCCl3 cells, the use of optimal experimental conditions was required: cells were used at
432 passage 7, cultured in the presence of 1000 mUI/L TSH in the culture medium.

Besides that, for screening hydrophobic compounds in toxicological studies, a solvent like dimethylsulfoxide (DMSO) is inevitable to solubilize compounds and treated cells in the culture medium. Therefore, it was important to assess whether a standard DMSO concentration, 0.1% would influence expression of the genes of interest. Our results demonstrated that a concentration of 0.1% (vol/vol) DMSO in cell culture medium did not modify *per se* the expression of genes selected for screening thyroid toxicity, such as Tpo, Tg, Duox1, Notch1, Pttg1, and Gtse1, Fig. 2.

3. Relevance of a PCCl3-based *in vitro* screening assay for thyroid toxicity.

The present work showed the relevance of an early screening *in vitro* assay using the gene expression profiles obtained from treated-PCCl3 cells. The aim is to discriminate direct-acting thyroid toxicants from compounds that do not have effects the thyroid gland. In our study, the four thyroid toxicant tested induced relative gene expression profiles different from the ones induced by the compounds having no thyroid toxicity effect (Fig. 4). These four thyroid toxicants are toxic *in vivo* mainly through three mechanisms of action (table 1). Our PCCl3-based *in vitro* assay for thyroid toxicity screening could therefore integrate multiple modes of action, in contrast with existing *in vitro* tests which target a unique mode of action, *i.e.* direct interaction with TPO or NIS (OECD, 2014). Furthermore, the toxicants acting on the thyroid gland through other mechanisms, such as iodide in excess, lithium (Radvila et al., 1976; Singh et al., 1994; Temple et al., 1972), or amiodarone (van Beeren et al. 2012; Wolff 1998; Pitsiavas et al. 1999), cannot be detected using TPO and NIS screening tests; In the present study, Nal was detected as a thyroid toxicant thanks to our assay model using gene expression profiles of PCCl3 (Fig. 4). Thus, we can make the hypothesis that the other compounds, potentially toxic

455 for the thyroid gland through complex mechanisms, could be also detected thanks to this assay.
456 Thus, even we have not developed and validated a real new *in vitro* assay, we established the
457 proof of a concept of screening *in vitro* thyroid toxicity by combining mammal thyroid cell
458 culture and the profiles of relative gene expression.

459 Further investigations are needed to develop this screening molecular-based *in vitro*
460 assay which could advantageously replace TPO and NIS *in vitro* screening assays. This approach
461 could also participate to reduce the use of animals to identify thyroid toxicants not directly
462 targeting TPO nor NIS.

463 4. Further investigations on the screening molecular-based *in vitro* assay.

464 We tested the sensibility of the PCCl3 cell line to screen thyroid toxicity with only four
465 different toxicants and three different compounds, not known to be active on the thyroid
466 gland. Since we have established the proof of concept of discrimination between toxicants with
467 such an assay and have defined the optimal experimental conditions, more compounds have to
468 be tested to define the predictive value of the results. In particular, we found very high
469 similarity in transcriptional profiles of cells exposed to the two different THDCs targeting TPO,
470 such as MMI and PTU. The correspondence between the toxic mode of action and the gene
471 expression profiles has to be established thanks to performing the assay on the one part with
472 other thyroid toxicants targeting TPO and on the other part with compounds acting on thyroid
473 cells through other toxic modes of action documented. For example, inhibitors of the
474 sodium/iodide symporter (NIS) such as thiocyanate or nitrate could be tested to compare the
475 gene expression profiles obtained from thyroids of treated rats with ones from NaClO₄-treated

rats. Furthermore, the modalities to export this screening *in vitro* assay in other laboratories will require inter-laboratory calibration comparisons of the transcriptional profiles, obtained with some of the reference compounds as used in the present work. Actually, it is still to be established that the gene expression profiles would be similar in other laboratories. We also did not assess whether PCCl3 cultured in different laboratories worldwide remained stable enough to give similar results in strictly identical culture conditions. Indeed, the differences between our results and those of Leoni et al. (see discussion above) regarding Tpo and Tg gene expression in response to exposure to Nal could be the consequences of the evolution of one of the cell lines tested. Therefore, an inter-laboratory validation of the screening *in vitro* assay based on PCCl3 cell lines from different origins would be necessary to assess the relevance of gene expression profile comparison.

E. Conclusion

The present work proposes a new early screening *in vitro* assay to assess thyroid toxicity, using the gene expression profiles obtained from PCCl3 rat thyroid cells after 24h of treatment. We have provided proof of concept that discriminates compounds targeting directly the thyroid hormone synthesis from compounds that do not affect thyroid function, by using up-regulated transcriptional expression profiles as criteria of positivity.

The screening *in vitro* assay based on the gene expression profiles of PCCl3 cells exposed to toxicants would have also the advantage to give information about the toxic modes of action of these compounds. This single *in vitro* study would be relevant to detect direct-acting thyroid toxicants *through* different mode of actions, and would also advantageously complete or

497 replace TPO and NIS *in vitro* screening assays. Its capacity to screen other modes of action than
498 those related to perturbations of TPO and NIS function, could therefore promote the reduction
499 of the number of animals used in toxicological studies.

References

- Abdelouahab, N., Suvorov, A., Pasquier, J.C., Langlois, M.F., Praud, J.P., Takser, L., 2009. Thyroid disruption by low-dose BDE-47 in prenatally exposed lambs. *Neonatology* 96, 120–124. doi:10.1159/000209316
- Al Khansa, I., Blanck, O., Guillouzo, A., Bars, R., 2010. Liverbeads: A practical and relevant in vitro model for gene induction investigations. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1598–1604. doi:10.1124/dmd.110.033753
- Al-Dujaili, E.A.S., Kenyon, C.J., Nicol, M.R., Mason, J.I., 2011. Liquorice and glycyrrhetic acid increase DHEA and deoxycorticosterone levels in vivo and in vitro by inhibiting adrenal SULT2A1 activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 102–9. doi:10.1016/j.mce.2010.12.011
- Andrade, B.M., Araujo, R.L., Perry, R.L., Souza, E.C., Cazarin, J.M., Carvalho, D.P., Ceddia, R.B., 2011. A novel role for AMP-kinase in the regulation of the Na⁺/I⁻-symporter and iodide uptake in the rat thyroid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1291–7. doi:ajpcell.00136.2010 [pii]10.1152/ajpcell.00136.2010
- Aqai, P., Fryganas, C., Mizuguchi, M., Haasnoot, W., Nielen, M.W.F., 2012. Triple bioaffinity mass spectrometry concept for thyroid transporter ligands. *Anal. Chem.* 84, 6488–93. doi:10.1021/ac300543u
- Aquila, S., De Amicis, F., 2014. Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete functions. *Exp. Cell Res.* 328, 303–313. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.015
- Attanasio, R., Scinicariello, F., Blount, B.C., Valentin-Blasini, L., Rogers, K.A., Nguyen, D.C., Murray, H.E., 2011. Pendrin mediates uptake of perchlorate in a mammalian in vitro system. *Chemosphere* 84, 1484–1488. doi:S0045-6535(11)00429-2 [pii]10.1016/j.chemosphere.2011.04.038
- Bakker, O., van Beeren, H.C., Wiersinga, W.M., 1994. Desethylamiodarone is a noncompetitive inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone beta 1-receptor protein. *Endocrinology* 134, 1665–1670. doi:10.1210/endo.134.4.8137729
- Balta, a. Z., Filiz, a. I., Kurt, Y., Sucullu, I., Yucel, E., Akin, M.L., 2012. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med. Oncol.* 29, 734–741. doi:10.1007/s12032-011-9969-x
- Becker, R.A., Bergfelt, A.D.R., Borghoff, S., Davis, J.P., Hamby, B.T., Connor, J.C.O., Kaplan, A.M., Sloan, C.S., Tyl, R.W., Wade, M., Marty, M.S., 2012. Interlaboratory Study Comparison of the 15-Day Intact Adult Male Rat Screening Assay: Evaluation of an Antithyroid Chemical and a Negative Control Chemical. *Birth defects Res.* 95, 63–78. doi:10.1002/bdrb.20343
- Bellinger, D.C., 2013. Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update. *Saf. Health Work* 4, 1–11. doi:10.5491/SHAW.2013.4.1.1

538 Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. WHO. State-of-the-science
539 of endocrine disrupting chemicals, 2012, Toxicology Letters.
540 doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020

541 Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? Environ.
542 Health Perspect. 112, 9–17.

543 Blystone, C.R., Lambright, C.S., Furr, J., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2007. Iprodione delays male
544 rat pubertal development , reduces serum testosterone levels , and decreases ex vivo
545 testicular testosterone production & 174, 74–81. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.010

546 Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., 2006. Environmental chemicals
547 and thyroid function. Eur. J. Endocrinol. 154, 599–611. doi:10.1530/eje.1.02128

548 Bock, K.W., 2011. From differential induction of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver to
549 characterization of responsible ligand-activated transcription factors, and their
550 multilevel crosstalk in humans. Biochem Pharmacol 82, 9–16. doi:S0006-
551 2952(11)00178-X [pii]10.1016/j.bcp.2011.03.011

552 Braun, D., Lelios, I., Krause, G., Schweizer, U., 2013. Histidines in potential substrate
553 recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8
554 (MCT8). Endocrinology 154, 2553–61. doi:10.1210/en.2012-2197

555 Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E., Bergman,
556 A., Visser, T.J., 1998. Interactions of persistent environmental organohalogens with the
557 thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and
558 human health. Toxicol Ind Heal. 14, 59–84.

559 Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA
560 expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive
561 androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor
562 alpha, and nuclear factor e. Drug Metab Dispos 37, 847–856. doi:dmd.108.024190
563 [pii]10.1124/dmd.108.024190 [doi]

564 Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase mRNA
565 Expression in Liver and Intestine by Activators of Aryl- Hydrocarbon Receptor ,
566 Constitutive Androstane Receptor , Pregnane X Receptor , Peroxisome Proliferator-
567 Activated Receptor □ , and Nuclear Factor 37, 847–856.
568 doi:10.1124/dmd.108.024190.regarded

569 Butt, C.M., Wang, D., Stapleton, H.M., 2011. Halogenated phenolic contaminants inhibit the
570 in vitro activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. Toxicol. Sci. 124,
571 339–47. doi:10.1093/toxsci/kfr117

572 Calil-Silveira, J., Serrano-Nascimento, C., Nunes, M.T., 2012. Iodide treatment acutely
573 increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCL3 thyroid
574 cell line by transcriptional mechanisms. Mol Cell Endocrinol 350, 118–124. doi:S0303-
575 7207(11)00710-6 [pii] 10.1016/j.mce.2011.12.002

576 Cao, J., Lin, Y., Guo, L.-H., Zhang, A.-Q., Wei, Y., Yang, Y., 2010. Structure-based investigation

577 on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with
578 thyroxine transport proteins. *Toxicology* 277, 20–8. doi:10.1016/j.tox.2010.08.012

579 Capen, C.C., 1994. Mechanisms of chemical injury of thyroid gland. *Prog. Clin. Biol. Res.* 387,
580 173–191.

581 Capri, Y., Friesema, E.C.H., Kersseboom, S., Touraine, R., Monnier, A., Eymard-Pierre, E., Des
582 Portes, V., De Michele, G., Brady, A.F., Boespflug-Tanguy, O., Visser, T.J., Vaur-Barriere,
583 C., 2013. Relevance of different cellular models in determining the effects of mutations
584 on SLC16A2/MCT8 thyroid hormone transporter function and genotype-phenotype
585 correlation. *Hum. Mutat.* 34, 1018–25. doi:10.1002/humu.22331

586 Cariou, B., Zaïr, Y., Staels, B., Bruckert, E., 2011. Effects of the new dual PPAR α/δ agonist
587 GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined
588 dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 34, 2008–14.
589 doi:10.2337/dc11-0093

590 Carre, A., Rachdi, L., Tron, E., Richard, B., Castanet, M., Schlumberger, M., Bidart, J.M.,
591 Szinnai, G., Polak, M., 2011. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and
592 differentiation during mouse thyroid gland development. *PLoS One* 6.
593 doi:10.1371/journal.pone.0016752

594 Carreón-Rodríguez, A., Charli, J.-L., Pérez-Martínez, L., 2009. T3 differentially regulates TRH
595 expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res.* 1305, 20–30.
596 doi:10.1016/j.brainres.2009.09.042

597 Chang, H., Hu, J., Shao, B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in
598 sewage treatment plants and receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3462–8.

599 Chauhan, K.R., Kodavanti, P.R., McKinney, J.D., 2000. Assessing the role of ortho-substitution
600 on polychlorinated biphenyl binding to transthyretin, a thyroxine transport protein.
601 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 10–21. doi:10.1006/taap.1999.8826

602 Chevalier, N., Fénichel, P., 2015. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of
603 type 2 diabetes? *Diabetes Metab.* 41, 107–115. doi:10.1016/j.diabet.2014.09.005

604 Chlouchi, A., Girard, C., Bonet, A., Viollon-Abadie, C., Heyd, B., Manton, G., Martin, H.,
605 Richert, L., 2007. Effect of chrysin and natural coumarins on UGT1A1 and 1A6 activities
606 in rat and human hepatocytes in primary culture. *Planta Med* 73, 742–747.
607 doi:10.1055/s-2007-981548 [doi]

608 Colborn, T., 2004. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ. Health Perspect.*
609 112, 944–949. doi:10.1289/ehp.6601

610 Craft, E.S., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2002. Comparative responsiveness of
611 hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in Long-Evans rats versus C57BL/6J
612 mice exposed to TCDD-like and phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners.
613 *Toxicol Sci* 68, 372–380.

614 Crofton, K.M., Zoeller, R.T., 2005. Mode of action: neurotoxicity induced by thyroid hormone
615 disruption during development--hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Crit Rev*

616 Toxicol 35, 757–769.

617 Cunha Lima, S.T., Nguyen, N.-H., Togashi, M., Apriletti, J.W., Nguyen, P., Polikarpov, I.,
618 Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Webb, P., 2009. Differential effects of TR ligands on hormone
619 dissociation rates: evidence for multiple ligand entry/exit pathways. *J. Steroid Biochem.*
620 *Mol. Biol.* 117, 125–31. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.08.003

621 De Gregorio, F., Pellegrino, M., Picchietti, S., Belardinelli, M.C., Taddei, A.R., Fausto, A.M.,
622 Rossi, M., Maggio, R., Giorgi, F., 2011. The insecticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-
623 chlorophenyl) ethane (DDT) alters the membrane raft location of the TSH receptor
624 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 121–9.
625 doi:10.1016/j.taap.2011.03.018

626 De Sandro, V., Catinot, R., Kriszt, W., Cordier, A., Richert, L., 1992. Male rat hepatic udp-
627 glucuronosyltransferase activity toward thyroxine. *Biochem. Pharmacol.*
628 doi:10.1016/0006-2952(92)90215-5

629 Delbès, G., Levacher, C., Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular
630 development. *Reproduction* 132, 527–38. doi:10.1530/rep.1.01231

631 Dellarco, V.L., McGregor, D., Berry, S.C., Cohen, S.M., Boobis, A.R., 2006. Thiazopyr and
632 thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance
633 Framework for analysis of a cancer mode of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 793–801.
634 doi:10.1080/10408440600975242

635 Devonshire, A.S., Elaswarapu, R., Foy, C. a, 2011. Applicability of RNA standards for
636 evaluating RT-qPCR assays and platforms. *BMC Genomics* 12, 118. doi:10.1186/1471-
637 2164-12-118

638 Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M.,
639 Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society
640 scientific statement. *Endocr Rev* 30, 293–342. doi:30/4/293 [pii]10.1210/er.2009-0002
641 [doi]

642 Dronjak, S., Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Varagic, V., 2007. Effects of noradrenaline and
643 serotonin reuptake inhibitors on pituitary-adrenocortical and sympatho-
644 adrenomedullar system of adult rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 614–20.

645 Ek, M., Soderdahl, T., Kuppers-Munther, B., Edsbacke, J., Andersson, T.B., Bjorquist, P.,
646 Cotgreave, I., Jernstrom, B., Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., 2007. Expression of
647 drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic
648 stem cells. *Biochem Pharmacol* 74, 496–503. doi:S0006-2952(07)00293-6
649 [pii]10.1016/j.bcp.2007.05.009

650 Elaković, I., Vasiljević, D., Adzic, M., Djordjevic, A., Djordjevic, J., Radojčić, M., Matić, G.,
651 2010. Sexually dimorphic functional alterations of rat hepatic glucocorticoid receptor in
652 response to fluoxetine. *Eur. J. Pharmacol.* 632, 79–85. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.015

653 Eng, P.H.K., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W.,
654 Braverman, L.E., 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a

655 decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein.
656 *Endocrinology* 140, 3404–3410. doi:10.1210/endo.140.8.6893

657 EPA, n.d. Tier 1 Screening Battery | Endocrine Disruptor Screening Program | US EPA.

658 European Commission, 2015. EC - Endocrine disruptors [WWW Document]. URL
659 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm (accessed
660 6.4.15).

661 Feng, F., Wang, H., Fu, H., Wu, S., Ye, Z., Chen, S., Li, J., n.d. Dedifferentiation of
662 differentiated thyroid carcinoma cell line FTC-133 is enhanced by 131I pretreatment.
663 *Nucl Med Biol* 38, 1053–1058. doi:S0969-8051(11)00054-0
664 [pii]10.1016/j.nucmedbio.2011.03.001

665 Fernández, L.P., López-Márquez, A., Santisteban, P., 2014. Thyroid transcription factors in
666 development, differentiation and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 29–42.
667 doi:10.1038/nrendo.2014.186

668 Ferretti, E., Tosi, E., Po, a, Scipioni, a, Morisi, R., Espinola, M.S., Russo, D., Durante, C.,
669 Schlumberger, M., Screpanti, I., Filetti, S., Gulino, a, 2008. Notch signaling is involved in
670 expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid
671 tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4080–7. doi:10.1210/jc.2008-0528

672 Finch, J.M., Osimitz, T.G., Gabriel, K.L., Martin, T., Henderson, W.J., Capen, C.C., Butler, W.H.,
673 Lake, B.G., 2006. A mode of action for induction of thyroid gland tumors by Pyrethrins
674 in the rat 214, 253–262. doi:10.1016/j.taap.2006.01.009

675 Fini, J.-B., Riu, A., Debrauwer, L., Hillenweck, A., Le Mével, S., Chevolleau, S., Boulahtouf, A.,
676 Palmier, K., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Demeneix, B.A., Zalko, D., 2012. Parallel
677 biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus*
678 as a model for endocrine perturbation studies. *Toxicol. Sci.* 125, 359–67.
679 doi:10.1093/toxsci/kfr312

680 Flynn, T.R., Hollenberg, A.N., Cohen, O., Menke, J.B., Usala, S.J., Tollin, S., Hegarty, M.K.,
681 Wondisford, F.E., 1994. A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor
682 selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J. Biol. Chem.* 269, 32713–6.

683 Fournel-Gigleux, S., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., Magdalou, J., 2010. The use of
684 hepatocytes to investigate UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases.
685 *Methods Mol. Biol.* 640, 309–26. doi:10.1007/978-1-60761-688-7_17

686 Freyberger, A., Ahr, H.-J., 2006. Studies on the goitrogenic mechanism of action of. *Stud.*
687 *goitrogenic Mech. action N,N,N?,N?-tetramethylthiourea* 217, 169–175.
688 doi:10.1016/j.tox.2005.09.005

689 Furuhashi, M., Suganuma, N., 2003. Effect of additional N-glycosylation signal in the N-
690 terminal region on intracellular function of the human gonadotropin alpha-subunit.
691 *Endocr. J.* 50, 245–53.

692 Fusco, a, Berlingieri, M.T., Di Fiore, P.P., Portella, G., Grieco, M., Vecchio, G., 1987. One- and
693 two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol.*

694 Cell. Biol. 7, 3365–3370. doi:10.1128/MCB.7.9.3365.Updated

695 Gelbke, H.P., Hofmann, A., Owens, J.W., Freyberger, A., 2007. The enhancement of the
 696 subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active
 697 chemicals: Comparison with toxicity tests of longer duration. Arch. Toxicol. 81, 227–
 698 250. doi:10.1007/s00204-006-0148-3

699 Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., De Felice, M.,
 700 Ambrosino, C., 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression.
 701 Toxicology 304, 21–31. doi:10.1016/j.tox.2012.12.001

702 Gierach, I., Li, J., Wu, W.-Y., Grover, G.J., Wood, D.W., 2012. Bacterial biosensors for
 703 screening isoform-selective ligands for human thyroid receptors α -1 and β -1. FEBS Open
 704 Bio 2, 247–53. doi:10.1016/j.fob.2012.08.002

705 Giuliani, C., Bucci, I., Di, S., Rossi, C., Grassadonia, A., Piantelli, M., Napolitano, G., 2014. The
 706 flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function.
 707 FOOD Chem. Toxicol. 66, 23–29. doi:10.1016/j.fct.2014.01.016

708 Giuliani, C., Noguchi, Y., Harii, N., Napolitano, G., Tatone, D., Bucci, I., Piantelli, M., Monaco,
 709 F., Kohn, L.D., 2008. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in
 710 rat FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology 149, 84–92. doi:10.1210/en.2007-0618

711 Glatt, C.M., Ouyang, M., Welsh, W., Green, J.W., Connor, J.O., Frame, S.R., Everds, N.E.,
 712 Poindexter, G., Snajdr, S., Delker, D. a., 2005. Molecular Characterization of Thyroid
 713 Toxicity: Anchoring Gene Expression Profiles to Biochemical and Pathologic End Points.
 714 Environ. Health Perspect. 113, 1354–1361. doi:10.1289/ehp.7690

715 Golstein, J., Kimura, T., Miot, F., Dumont, J.E., 1999. Loss of several cell functions including
 716 okadaic acid-induced apoptosis after multiple passages in FRTL-5 cells. Mol. Cell.
 717 Endocrinol. 150, 141–149. doi:10.1016/S0303-7207(99)00009-X

718 Groef, B. De, Decallonne, B.R., Geyten, S. Van Der, Darras, V.M., Bouillon, R., 2006.
 719 Perchlorate versus other environmental sodium / iodide symporter inhibitors : potential
 720 thyroid-related health effects 17–25. doi:10.1530/eje.1.02190

721 Grün, F., 2010. Obesogens. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes. 17, 453–459.
 722 doi:10.1097/MED.0b013e32833ddea0

723 Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M.,
 724 Kanno, J., Iguchi, T., Blumberg, B., 2006. Endocrine-disrupting organotin compounds are
 725 potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol. Endocrinol. 20, 2141–55.
 726 doi:10.1210/me.2005-0367

727 Hapgood, J.P., Koubovec, D., Louw, A., Africander, D., 2004. Not all progestins are the same:
 728 implications for usage. Trends Pharmacol. Sci. 25, 554–7.
 729 doi:10.1016/j.tips.2004.09.005

730 Hard, G., 1998. Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid
 731 carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 106, 427–436.

732 Hashimoto, K., Zanger, K., Hollenberg, A.N., Cohen, L.E., Radovick, S., Wondisford, F.E., 2000.
733 cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-
734 releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J. Biol. Chem.* 275, 33365–
735 72. doi:10.1074/jbc.M006819200

736 Heaney, A.P., Nelson, V., Fernando, M., Horwitz, G., 2001. Transforming events in thyroid
737 tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86,
738 5025–5032. doi:10.1210/jc.86.10.5025

739 Hood, A., Hashmi, R., Klaassen, C.D., Proliferation, C., Hood, H., Pharmacol, C.D.T.A., 1999.
740 Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid-Follicular Cell Proliferation,
741 Hyperplasia, and Hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 163–170.

742 Hornung, M.W., Degitz, S.J., Korte, L.M., Olson, J.M., Kosian, P. a, Linnum, A.L., Tietge, J.E.,
743 2010. Inhibition of thyroid hormone release from cultured amphibian thyroid glands by
744 methimazole, 6-propylthiouracil, and perchlorate. *Toxicol. Sci.* 118, 42–51.
745 doi:10.1093/toxsci/kfq166

746 Hurley, P.M., Hill, R.N., Whiting, R.J., 1998. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides
747 Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents. *Environ. Health Perspect.* 106, 437.
748 doi:10.2307/3434175

749 INSERM, 2008. Cancer et Environnement. Expertise collective, INSERM.

750 Jahnke, G.D., Choksi, N.Y., Moore, J. a., Shelby, M.D., 2004. Thyroid toxicants: Assessing
751 reproductive health effects. *Environ. Health Perspect.* 112, 363–368.
752 doi:10.1289/ehp.6637

753 Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J., 2005. Organotin
754 compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome
755 proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol. Pharmacol.*
756 67, 766–74. doi:10.1124/mol.104.008409

757 Kato, Y., Ikushiro, S., Emi, Y., Tamaki, S., Suzuki, H., Sakaki, T., Yamada, S., Degawa, M., 2008.
758 Hepatic UDP-Glucuronosyltransferases Responsible for Glucuronidation of Thyroxine in
759 Humans ABSTRACT : 36, 51–55. doi:10.1124/dmd.107.018184.glucuronidation

760 Kennel, P.F., Pallen, C.T., Bars, R.G., 2004. Evaluation of the rodent Hershberger assay using
761 three reference endocrine disrupters (androgen and antiandrogens). *Reprod. Toxicol.*
762 18, 63–73. doi:10.1016/j.reprotox.2003.10.012

763 Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001.
764 Regulation of thyroid cell proliferation by tsh and other factors: A critical evaluation of
765 in vitro models. *Endocr. Rev.* 22, 631–656. doi:10.1210/er.22.5.631

766 King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D., Tephly, T.R., 2000. UDP-Glucuronosyltransferases 143–
767 161.

768 Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H.,
769 Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., 2005. Anti-thyroid hormonal activity of
770 tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the

771 mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.*
772 76, 1589–601. doi:10.1016/j.lfs.2004.08.030

773 Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2011. Toxicologic Pathology Effects of Microsomal Enzyme
774 Inducers on Thyroid Follicular Cell. doi:10.1080/019262301301418838

775 Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2001. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular
776 cell proliferation and thyroid hormone metabolism. *Toxicol Pathol* 29, 34–40.

777 Klammer, H., Schlecht, C., Wuttke, W., Schmutzler, C., Gotthardt, I., Kohrle, J., Jarry, H., 2007.
778 Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the
779 function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology* 238, 192–
780 199. doi:S0300-483X(07)00324-1 [pii]10.1016/j.tox.2007.06.088

781 Klecha, A.J., Barreiro Arcos, M.L., Frick, L., Genaro, A.M., Cremaschi, G., 2008. Immune-
782 endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation* 15,
783 68–75. doi:10.1159/000135626

784 Kobayashi, K., Akune, H., Sumida, K., Saito, K., Yoshioka, T., Tsuji, R., 2009. Perinatal
785 exposure to PTU decreases expression of Arc, Homer 1, Egr 1 and Kcna 1 in the rat
786 cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1264, 24–32.
787 doi:10.1016/j.brainres.2008.12.029

788 Kodavanti, P.R.S., Curras-Collazo, M.C., 2010. Neuroendocrine actions of organohalogenes:
789 thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.*
790 31, 479–96. doi:10.1016/j.yfrne.2010.06.005

791 Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T., 1987. Thyroid hormones regulate levels
792 of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad*
793 *Sci U S A* 84, 7329–7333.

794 Kotake, Y., 2012. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals.
795 *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1876–80.

796 Larsen, D.A., Swanson, P., Dickey, J.T., Rivier, J., Dickhoff, W.W., 1998. In vitro thyrotropin-
797 releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon,
798 *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 276–85.
799 doi:10.1006/gcen.1997.7031

800 Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Cooper, R.L., 2003. Pubertal development in female
801 Wistar rats following exposure to propazine and atrazine biotransformation by-
802 products, diamino-5-chlorotriazine and hydroxyatrazine. *Toxicol Sci* 76, 190–200.
803 doi:10.1093/toxsci/kfg223kfg223 [pii]

804 Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J., Cooper, R.L., 2000. The Effects of Atrazine on
805 Female Wistar Rats : An Evaluation of the Protocol for Assessing Pubertal Development
806 and Thyroid Function. *Toxicol. Sci.* 376, 366–376.

807 Lecat-guillet, N., Merer, G., Lopez, R., Pourcher, T., 2008. Small-Molecule Inhibitors of
808 Sodium Iodide Symporter Function 06107, 889–895. doi:10.1002/cbic.200700682

- 809 Leoni, S.G., Galante, P.A., Ricarte-Filho, J.C., Kimura, E.T., 2008. Differential gene expression
810 analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics* 91, 356–366.
811 doi:S0888-7543(08)00017-7 [pii]10.1016/j.ygeno.2007.12.009
- 812 Leoni, S.G., Kimura, E.T., Santisteban, P., De la Vieja, A., 2011. Regulation of thyroid oxidative
813 state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess.
814 *Mol Endocrinol* 25, 1924–1935. doi:me.2011-0038 [pii]10.1210/me.2011-0038
- 815 Lévy-Bimbot, M., Major, G., Courilleau, D., Blondeau, J.-P., Lévi, Y., 2012.
816 Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: use
817 of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding.
818 *Chemosphere* 87, 782–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.080
- 819 Lezoualc'h, F., Hassan, A.H., Giraud, P., Loeffler, J.P., Lee, S.L., Demeneix, B.A., 1992.
820 Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent
821 inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick
822 hypothalamic neurons. *Mol. Endocrinol.* 6, 1797–804. doi:10.1210/mend.6.11.1480171
- 823 Lowry, C.A., Hale, M.W., Plant, A., Windle, R.J., Shanks, N., Wood, S.A., Ingram, C.D., Renner,
824 K.J., Lightman, S.L., Summers, C.H., 2009. Fluoxetine inhibits corticotropin-releasing
825 factor (CRF)-induced behavioural responses in rats. *Stress* 12, 225–39.
826 doi:10.1080/10253890802309861
- 827 Lv, M., Zhang, X., Li, M., Chen, Q., Ye, M., Liang, W., Ding, L., Cai, H., Fu, D., Lv, Z., 2013. miR-
828 26a and its Target CKS2 Modulate Cell Growth and Tumorigenesis of Papillary Thyroid
829 Carcinoma. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0067591
- 830 Ma, X., Lian, Q.-Q., Dong, Q., Ge, R.-S., 2011. Environmental inhibitors of 11 β -hydroxysteroid
831 dehydrogenase type 2. *Toxicology* 285, 83–9. doi:10.1016/j.tox.2011.04.007
- 832 Mackenzie, P.I., Bock, K.W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O.,
833 Owens, I.S., Nebert, D.W., 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP
834 glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15, 677–685.
835 doi:01213011-200510000-00001 [pii]
- 836 Marchesini, G.R., Meulenberg, E., Haasnoot, W., Mizuguchi, M., Irth, H., 2006. Biosensor
837 recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. *Anal. Chem.* 78,
838 1107–14. doi:10.1021/ac051399i
- 839 Martin, M.T., Brennan, R.J., Hu, W., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H., Wood, C.R., Corton, J.C.,
840 Kavlock, R.J., Dix, D.J., 2007. Toxicogenomic study of triazole fungicides and
841 perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on
842 mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* 97, 595–613. doi:10.1093/toxsci/kfm065
- 843 Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M., 2009.
844 The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3
845 catabolism in macrophages. *Toxicol. Sci.* 109, 50–8. doi:10.1093/toxsci/kfp044
- 846 Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmacokinetics
847 of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and

848 identification of knowledge gaps. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 696–724.
849 doi:10.3109/10408444.2014.930813

850 McClain, R.M., 1995. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid
851 neoplasia to human risk assessment. *Mutat. Res.* 333, 131–142. doi:10.1016/0027-
852 5107(95)00139-5

853 McClain, R.M., Levin, A.A., Posch, R., Downing, J.C., 1989. The effect of phenobarbital on the
854 metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 99, 216–228.
855 doi:0041-008X(89)90004-5 [pii]

856 McClain, R.M., Posch, R.C., Bosakowski, T., Armstrong, J.M., 1988. Studies on the mode of
857 action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. *Toxicol Appl*
858 *Pharmacol* 94, 254–265.

859 Mcdougal, J.N., Jones, K.L., Fatuyi, B., Gray, K.J., Blount, B.C., Valentín-blasini, L., Fisher, J.W.,
860 2011. Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues The
861 Effects of Perchlorate on Thyroidal Gene Expression are Different from the Effects of
862 Iodide Deficiency 37–41. doi:10.1080/15287394.2011.573740

863 McLean, A.E., Driver, H.E., Sutherland, I.A., 1992. Liver tumour promotion by phenobarbital:
864 comparison of rat and human studies. *Prog Clin Biol Res* 374, 251–259.

865 Meek, M.E.B., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKeeman, L.D.,
866 Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D.E., 2003. A framework for human
867 relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit. Rev. Toxicol.*
868 33, 591–653. doi:10.1080/713608373

869 Meireles, A.M., Preto, A., Rocha, A.S., Rebocho, A.P., Maximo, V., Pereira-Castro, I., Moreira,
870 S., Feijao, T., Botelho, T., Marques, R., Trovisco, V., Cirnes, L., Alves, C., Velho, S., Soares,
871 P., Sobrinho-Simoes, M., 2007. Molecular and genotypic characterization of human
872 thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid* 17, 707–715.
873 doi:10.1089/thy.2007.0097

874 Merrill, E.A., Clewell, R.A., Gearhart, J.M., Robinson, P.J., Sterner, T.R., Yu, K.O., Mattie, D.R.,
875 Fisher, J.W., 2003. PBPK Predictions of Perchlorate Distribution and Its Effect on Thyroid
876 Uptake of Radioiodide in the Male Rat. *Toxicol. Sci.* 73, 256–269.
877 doi:10.1093/toxsci/kfg080

878 Mijiddorj, T., Kanasaki, H., Purwana, I.N., Oride, A., Miyazaki, K., 2011. Stimulatory effect of
879 pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I
880 receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells.
881 *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 172–9. doi:10.1016/j.mce.2011.04.010

882 Miller, M.D., Crofton, K.M., Rice, D.C., Zoeller, R.T., 2009. Thyroid-disrupting chemicals:
883 interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Env. Heal. Perspect* 117, 1033–
884 1041. doi:10.1289/ehp.0800247 [doi]

885 Miot, F., Dupuy, C., Dumont, J., Rousset, B., 2000. Thyroid Hormone Synthesis and Secretion,
886 in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman,

887 J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O.
888 (Eds.), . South Dartmouth (MA).

889 Monte, M., Benetti, R., Buscemi, G., Sandy, P., Del Sal, G., Schneider, C., 2003. The cell cycle-
890 regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting
891 p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 30356–30364. doi:10.1074/jbc.M302902200

892 Moon, M.K., Jeong, I.-K., Oh, T.J., Ahn, H.Y., Kim, H.H., Park, Y.J., Jang, H.C., Park, K.S., 2015.
893 Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin
894 resistance. *J. Endocrinol.* doi:10.1530/JOE-14-0714

895 Mullur, R., Liu, Y.-Y., Brent, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol.*
896 *Rev.* 94, 355–82. doi:10.1152/physrev.00030.2013

897 Murk, A.J., Rijntjes, E., Blaauboer, B.J., Clewell, R., Crofton, K.M., Dingemans, M.M.L., Furlow,
898 J.D., Kavlock, R., Köhrle, J., Opitz, R., Traas, T., Visser, T.J., Xia, M., Gutleb, A.C., 2013.
899 Toxicology in Vitro Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for
900 identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicol. Vit.* 27, 1320–1346.
901 doi:10.1016/j.tiv.2013.02.012

902 Newbold, R.R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol.*
903 *Appl. Pharmacol.* 199, 142–50. doi:10.1016/j.taap.2003.11.033

904 Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N., 2009. Environmental estrogens and
905 obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–9. doi:10.1016/j.mce.2009.02.024

906 Nishimura, N., Nishimura, H., Ito, T., Miyata, C., Izumi, K., Fujimaki, H., Matsumura, F., 2009.
907 Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its
908 inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity.
909 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 301–9.

910 Noda, S., Muroi, T., Takakura, S., Sakamoto, S., Takatsuki, M., Yamasaki, K., Tateyama, S.,
911 Yamaguchi, R., 2005. Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid
912 function modulators. *Arch. Toxicol.* 79, 627–635. doi:10.1007/s00204-005-0677-1

913 O Connor, J.C., Frame, S.R., Ladics, G.S., 2002. Evaluation of a 15-day screening assay using
914 intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators.
915 *Toxicol. Sci.* 69, 79–91. doi:10.1093/toxsci/69.1.79

916 OECD, 2014. New Scoping Document on in vitro and ex vivo Assays for the Identification of
917 Modulators of Thyroid Hormone Signalling.

918 OECD, 2012a. Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel in vitro and in vivo
919 Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors.

920 OECD, 2012b. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals
921 for Endocrine Disruption.

922 OECD, 2006a. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays, Series on
923 Testing and Assessment. OECD.

924 OECD, 2006b. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assay.

925 Ohba, K., Sasaki, S., Matsushita, A., Iwaki, H., Matsunaga, H., Suzuki, S., Ishizuka, K., Misawa,
926 H., Oki, Y., Nakamura, H., 2011. GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-
927 induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. *PLoS One* 6, e18667.
928 doi:10.1371/journal.pone.0018667

929 Olsen, J.H., Wallin, H., Boice Jr., J.D., Rask, K., Schulgen, G., Fraumeni Jr., J.F., 1993.
930 Phenobarbital, drug metabolism, and human cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*
931 2, 449–452.

932 Ortega, E., Osorio, A., Ruiz, E., 1996. Inhibition of 5'DI and 5'DII L-tiroxine (T4)
933 monodeiodinases. Effect on the hypothalamo-pituitary ovarian axis in adult
934 hypothyroid rats treated with T4. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 853–860.

935 Papineni, S., Marty, M.S., Rasoulpour, R.J., LeBaron, M.J., Pottenger, L.H., Eisenbrandt, D.L.,
936 2015. Mode of action and human relevance of pronamide-induced rat thyroid tumors.
937 *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 541–551. doi:10.1016/j.yrtph.2015.02.012

938 Park, J.W., Zarnegar, R., Kanauchi, H., Wong, M.G., Hyun, W.C., Ginzinger, D.G., Lobo, M.,
939 Cotter, P., Duh, Q.Y., Clark, O.H., 2005. Troglitazone, the peroxisome proliferator-
940 activated receptor-gamma agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in
941 human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 15, 222–231. doi:10.1089/thy.2005.15.222

942 Patrick, L., 2009. Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health.
943 *Altern Med Rev* 14, 326–346.

944 Paul, K.B., Hedge, J.M., Macherla, C., Filer, D.L., Burgess, E., Simmons, S.O., Crofton, K.M.,
945 Hornung, M.W., 2013. Cross-species analysis of thyroperoxidase inhibition by
946 xenobiotics demonstrates conservation of response between pig and rat. *Toxicology*
947 312, 97–107. doi:10.1016/j.tox.2013.08.006

948 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Crofton, K.M., Hornung, M.W., Simmons, S.O., 2014a.
949 Development of Medium-Throughput Thyroperoxidase (TPO) Inhibition Assays for
950 Screening, in: *Innovative Research for a Sustainable Future*. p. 4.

951 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014.
952 Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening.
953 *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–399. doi:10.1021/tx400310w

954 Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014b.
955 Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening.
956 *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–99. doi:10.1021/tx400310w

957 Pesce, L., Bizhanova, A., Caraballo, J.C., Westphal, W., Butti, M.L., Comellas, A., Kopp, P.,
958 2012. TSH regulates pendrin membrane abundance and enhances iodide efflux in
959 thyroid cells. *Endocrinology* 153, 512–521. doi:en.2011-1548 [pii] 10.1210/en.2011-
960 1548

961 Pickford, D.B., 2010. Screening chemicals for thyroid-disrupting activity: A critical comparison
962 of mammalian and amphibian models. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 845–92.
963 doi:10.3109/10408444.2010.494250

- 964 Pitsiavas, V., Smerdely, P., Boyages, S.C., 1999. Amiodarone compared with iodine exhibits a
965 potent and persistent inhibitory effect on TSH-stimulated cAMP production in vitro : a
966 possible mechanism to explain amiodarone-induced hypothyroidism 241–249.
- 967 Qatanani, M., Zhang, J., Moore, D.D., 2005. Role of the constitutive androstane receptor in
968 xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995–1002.
969 doi:en.2004-1350 [pii]10.1210/en.2004-1350
- 970 Radvila, A., Roost, R., Burgi, H., Kohler, H., Studer, H., 1976. Inhibition of thyroglobulin
971 biosynthesis and degradation by excess iodide. Synergism with lithium. *Acta Endocrinol.*
972 (Copenh). 81, 495–506.
- 973 Rajkovic, V., Matavulj, M., Johansson, O., 2010. Studies on the synergistic effects of
974 extremely low-frequency magnetic fields and the endocrine-disrupting compound
975 atrazine on the thyroid gland. *Int J Radiat Biol* 86, 1050–1060.
976 doi:10.3109/09553002.2010.501837
- 977 Raldúa, D., Babin, P.J., 2009. Simple, Rapid Zebrafish Larva Bioassay for Assessing the
978 Potential of Chemical Pollutants and Drugs to Disrupt Thyroid Gland Function. *Environ.*
979 *Sci. Technol.* 43, 6844–6850. doi:10.1021/es9012454
- 980 Raldúa, D., Thienpont, B., Babin, P.J., 2012. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative
981 system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis
982 and function. *Reprod. Toxicol.* 33, 188–197. doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.001
- 983 Rao, M.S., Reddy, J.K., 1987. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis.
984 *Carcinogenesis* 8, 631–6.
- 985 Renko, K., Hoefig, C.S., Hiller, F., Schomburg, L., Köhrle, J., 2012. Identification of iopanoic
986 acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay.
987 *Endocrinology* 153, 2506–13. doi:10.1210/en.2011-1863
- 988 Ri, F., Kerchner, G., Persing, R., RI, B., 1978. Dietary subacute toxicity of ethylene thiourea in
989 the laboratory rat . PubMed Commons 2014.
- 990 Richardson, V.M., Staskal, D.F., Ross, D.G., Diliberto, J.J., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S., 2008.
991 Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major
992 polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 244–50.
993 doi:10.1016/j.taap.2007.09.015
- 994 Ronco, A.M., Urrutia, M., Montenegro, M., Llanos, M.N., 2009. Cadmium exposure during
995 pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids.
996 *Toxicol. Lett.* 188, 186–91. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.008
- 997 Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M.,
998 Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose
999 tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–7.
- 1000 Rouquié, D., Tinwell, H., Blanck, O., Schorsch, F., Geter, D., Wason, S., Bars, R., 2014. Thyroid
1001 tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of
1002 hepatic CAR / PXR nuclear receptors. doi:10.1016/j.yrtph.2014.10.003

1003 Ruiz-Llorente, S., de Pau, E.C., Sastre-Perona, A., Montero-Conde, C., Gómez-López, G.,
 1004 Fagin, J. a, Valencia, A., Pisano, D.G., Santisteban, P., 2012. Genome-wide analysis of
 1005 Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* 13, 147.
 1006 doi:10.1186/1471-2164-13-147

1007 Santini, F., Vitti, P., Ceccarini, G., Mammoli, C., Rosellini, V., Pelosini, C., Marsili, A.,
 1008 Tonacchera, M., Agretti, P., Santoni, T., Chiovato, L., Pinchera, A., 2003. In vitro assay of
 1009 thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol*
 1010 *Invest* 26, 950–955. doi:5514 [pii]

1011 Schmutzler, C., Bacinski, A., Gotthardt, I., Huhne, K., Ambrugger, P., Klammer, H., Schlecht,
 1012 C., Hoang-Vu, C., Gruters, A., Wuttke, W., Jarry, H., Köhrle, J., 2007. The ultraviolet filter
 1013 benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro
 1014 inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148, 2835–2844.
 1015 doi:en.2006-1280 [pii]10.1210/en.2006-1280

1016 Schmutzler, C., Gotthardt, I., Hofmann, P.J., Radovic, B., Kovacs, G., Stemmler, L., Nobis, I.,
 1017 Bacinski, A., Mentrup, B., Ambrugger, P., Grüters, A., Malendowicz, L.K., Christoffel, J.,
 1018 Jarry, H., Seidlovà-wuttke, D., Wuttke, W., Köhrle, J., 2007. Monograph Endocrine
 1019 Disruptors and the Thyroid Gland — A Combined in Vitro and in Vivo Analysis of
 1020 Potential New Biomarkers 115, 77–83. doi:10.1289/ehp.9369

1021 Schuur, A.G., van Leeuwen-Bol, I., Jong, W.M., Bergman, A., Coughtrie, M.W., Brouwer, A.,
 1022 Visser, T.J., 1998. In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by
 1023 polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics. *Toxicol. Sci.* 45, 188–
 1024 94. doi:10.1006/toxs.1998.2504

1025 Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., Braun, D., 2014. Structure and function of thyroid
 1026 hormone plasma membrane transporters. *Eur. Thyroid J.* 3, 143–53.
 1027 doi:10.1159/000367858

1028 Serrano-Nascimento, C., Calil-Silveira, J., Goulart-Silva, F., Nunes, M.T., 2012. New insights
 1029 about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide
 1030 symporter (NIS) expression in PCCl3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 154–161.
 1031 doi:10.1016/j.mce.2011.09.036

1032 Shankar, K., Liu, X., Singhal, R., Chen, J.-R., Nagarajan, S., Badger, T.M., Ronis, M.J.J., 2008.
 1033 Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated
 1034 with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1).
 1035 *Endocrinology* 149, 1748–56. doi:10.1210/en.2007-0903

1036 Shelby, M.K., Klaassen, C.D., 2006. Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and
 1037 duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional
 1038 pathways. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1772–1778. doi:10.1124/dmd.106.010397

1039 Shen, O., Du, G., Sun, H., Wu, W., Jiang, Y., Song, L., Wang, X., 2009. Comparison of in vitro
 1040 hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays. *Toxicol. Lett.* 191,
 1041 9–14. doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.019

1042 Singh, B., Dhawan, D., Chand, B., 1994. Biokinetics of Iodine- 131 in Rat Thyroid Following
1043 Lead and Lithium Supplementation 287–293.

1044 Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome:
1045 an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum.*
1046 *Reprod.* 16, 972–8.

1047 Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A., Cederroth, C.R., Combescure, C., Nef, S., Aubert,
1048 M.L., Hüppi, P.S., 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in
1049 the rat. *Environ. Health Perspect.* 117, 1549–55. doi:10.1289/ehp.11342

1050 Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Fisher, J.S., Leffers, H., Rajpert-de Meyts, E., Skakkebaek,
1051 N.E., 2004. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ
1052 testis and the testicular dysgenesis syndrome? *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 88, 144–51.

1053 St Germain, D.L., 1988. Dual mechanisms of regulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase
1054 in the rat kidney, liver, and thyroid gland. Implications for the treatment of
1055 hyperthyroidism with radiographic contrast agents. *J. Clin. Invest.* 81, 1476–1484.

1056 St Germain, D.L., Galton, V.A., Hernandez, A., 2009. Minireview: Defining the roles of the
1057 iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150, 1097–
1058 107. doi:10.1210/en.2008-1588

1059 Stoker, T.E., Ferrell, J.M., Laws, S.C., Cooper, R.L., Buckalew, a., 2006. Evaluation of
1060 ammonium perchlorate in the endocrine disruptor screening and testing program's
1061 male pubertal protocol: Ability to detect effects on thyroid endpoints. *Toxicology* 228,
1062 58–65. doi:10.1016/j.tox.2006.08.026

1063 Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L., 2002. The effects of atrazine metabolites
1064 on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 67, 198–206.

1065 Stump, D.G., O'Connor, J.C., Lewis, J.M., Marty, M.S., 2014. Key Lessons from Performance of
1066 the U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 Male and Female
1067 Pubertal Assays. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 101, 43–62.
1068 doi:10.1002/bdrb.21097

1069 Sun, H., Shen, O.-X., Xu, X.-L., Song, L., Wang, X.-R., 2008. Carbaryl, 1-naphthol and 2-
1070 naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro.
1071 *Toxicology* 249, 238–42. doi:10.1016/j.tox.2008.05.008

1072 Susarla, R., Gonzalez, A.M., Watkinson, J.C., Eggo, M.C., 1992. Expression of receptors for
1073 VEGFs on normal human thyroid follicular cells and their role in follicle formation. *J Cell*
1074 *Physiol* 227, 1992–2002. doi:10.1002/jcp.22930

1075 Suvorov, A., Girard, S., Lachapelle, S., Abdelouahab, N., Sebire, G., Takser, L., 2009. Perinatal
1076 exposure to low-dose BDE-47, an emergent environmental contaminant, causes
1077 hyperactivity in rat offspring. *Neonatology* 95, 203–209. doi:10.1159/000155651

1078 Suzuki, K., Lavaroni, S., Mori, a, Ohta, M., Saito, J., Pietrarelli, M., Singer, D.S., Kimura, S.,
1079 Katoh, R., Kawaoi, a, Kohn, L.D., 1998. Autoregulation of thyroid-specific gene
1080 transcription by thyroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8251–8256.

doi:10.1073/pnas.95.14.8251

Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M., 2006. Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with beta-estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci* 97, 25–31. doi:CAS [pii]10.1111/j.1349-7006.2005.00132.x

Temple, R., Berman, M., Robbins, J., Wolff, J., 1972. The Use of Lithium the Treatment of Thyrotoxicosis 274.

Tong, Z., Li, H., Goljer, I., McConnell, O., Chandrasekaran, A., 2007. In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* 35, 2203–2210. doi:10.1124/dmd.107.016972

Trachtenberg, J., Zadra, J., 1988. Steroid synthesis inhibition by ketoconazole: sites of action. *Clin. Invest. Med.* 11, 1–5.

Tsujiro, M., Watahiki, Y., Yoshioka, K., Mutoh, K., 2007. Morphology of thyroid follicular cells of methimazole-treated rats. *Anat Histol Embryol* 36, 290–294. doi:AHE764 [pii]10.1111/j.1439-0264.2007.00764.x

Uchaipichat, V., Mackenzie, P.I., Guo, X.H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J.B., Miners, J.O., 2004. Human UDP-glucuronosyltransferases: Isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab. Dispos.* 32, 413–423. doi:10.1124/dmd.32.4.413

Uyttersprot, N., Costagliola, S., Dumont, J.E., Miot, F., 1999. Requirement for cAMP-response element (CRE) binding protein/CRE modulator transcription factors in thyrotropin-induced proliferation of dog thyroid cells in primary culture. *Eur. J. Biochem.* 259, 370–8.

Uzumcu, M., Kuhn, P.E., Marano, J.E., Armenti, A.E., Passantino, L., 2006. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 191, 549–58. doi:10.1677/joe.1.06592

van Beeren, H.C., Bakker, O., Wiersinga, W.M., 1995. Desethylamiodarone is a competitive inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone α -receptor protein. *Mol Cell Endocrinol* 112, 15 – 19.

van Beeren, H.C., Kwakkel, J., Ackermans, M.T., Wiersinga, W.M., Fliers, E., Boelen, A., 2012. Action of specific thyroid hormone receptor α (1) and β (1) antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat. *Thyroid* 22, 1275–82. doi:10.1089/thy.2012.0135

Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci.*

- Technol. 42, 5814–20.
- Vansell, N.R., 2002. Effect of Microsomal Enzyme Inducers on the Biliary Excretion of Triiodothyronine (T3) and Its Metabolites. *Toxicol. Sci.* 65, 184–191. doi:10.1093/toxsci/65.2.184
- Vansell, N.R., Klaassen, C.D., 2002. Increase in rat liver udp-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 30, 240–246. doi:10.1124/dmd.30.3.240
- Visser, T.J., 2000. Cellular Uptake of Thyroid Hormones, in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O. (Eds.), . South Dartmouth (MA).
- Walters, K.A., Simanainen, U., Handelsman, D.J., 2010. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum. Reprod. Update* 16, 543–58. doi:10.1093/humupd/dmq003
- Waltz, F., Pillette, L., Ambroise, Y., 2010. A nonradioactive iodide uptake assay for sodium iodide symporter function. *Anal. Biochem.* 396, 91–5. doi:10.1016/j.ab.2009.08.038
- Wang, F., Zhang, Q., Zhang, X., Luo, S., Ye, D., Guo, Y., Chen, S., Huang, Y., 2014. Preeclampsia induced by cadmium in rats is related to abnormal local glucocorticoid synthesis in placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 77. doi:10.1186/1477-7827-12-77
- Wang, Y.-X., Lee, C.-H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., Evans, R.M., 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159–70.
- Watkins, J.B., Klaassen, C.D., 1982. Induction of UDP-glucuronosyltransferase activities in Gunn, heterozygous, and Wistar rat livers by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *Drug Metab Dispos* 10, 590–594.
- Webb, P., Nguyen, N.-H., Chiellini, G., Yoshihara, H.A.I., Cunha Lima, S.T., Apriletti, J.W., Ribeiro, R.C.J., Marimuthu, A., West, B.L., Goede, P., Mellstrom, K., Nilsson, S., Kushner, P.J., Fletterick, R.J., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., 2002. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 59–73.
- Weiss, J.M., Andersson, P.L., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., van Leeuwen, S.P.J., Hamers, T., 2009. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol. Sci.* 109, 206–16. doi:10.1093/toxsci/kfp055
- Westholm, D.E., Stenehjem, D.D., Rumbley, J.N., Drewes, L.R., Anderson, G.W., 2009. Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Endocrinology* 150, 1025–32. doi:10.1210/en.2008-0188
- Wilson, M.R., 2009. The Endocrine System: Hormones, Growth, and Development. The Rosen Publishing Group.

1158 Wolff, J., 1998. Perchlorate and the Thyroid Gland. *Pharmacol. Rev.* 50, 89–105.

1159 Wolff, J., Chaikoff, I.L., 1948. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid
1160 function. *J. Biol. Chem.* 174, 555–564.

1161 Wu, B., Li, S., Dong, D., 2013. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic
1162 receptors CAR, PXR and VDR. *Drug Discov. Today* 18, 574–81.
1163 doi:10.1016/j.drudis.2013.01.001

1164 Wu, F., Zhou, X., Zhang, R., Pan, M., Peng, K.L., 2012. The effects of ammonium perchlorate
1165 on thyroid homeostasis and thyroid-specific gene expression in rat. *Environ. Toxicol.* 27,
1166 445–452. doi:10.1002/tox.20655

1167 You, S.H., Gauger, K.J., Bansal, R., Zoeller, R.T., 2006. 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct
1168 thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257-258, 26–34.
1169 doi:S0303-7207(06)00325-X [pii]10.1016/j.mce.2006.06.009 [doi]

1170 Yu, K.O., Narayanan, L., Mattie, D.R., Godfrey, R.J., Todd, P.N., Sterner, T.R., Mahle, D.A.,
1171 Lumpkin, M.H., Fisher, J.W., 2002. The pharmacokinetics of perchlorate and its effect on
1172 the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 182,
1173 148–159. doi:S0041008X02994329 [pii]

1174 Zhang, H.F., Lin, X.H., Yang, H., Zhou, L.C., Guo, Y.L., Barnett, J. V, Guo, Z.M., 2012. Regulation
1175 of the activity and expression of aryl hydrocarbon receptor by ethanol in mouse hepatic
1176 stellate cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 1873–81. doi:10.1111/j.1530-
1177 0277.2012.01787.x

1178 Zhang, N., Chu, E.S.H., Zhang, J., Li, X., Liang, Q., Chen, J., Chen, M., Teoh, N., Farrell, G.,
1179 Sung, J.J.Y., Yu, J., 2014. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits
1180 hepatocarcinogenesis through mediating NF-κB signaling pathway. *Oncotarget* 5, 8330–
1181 40.

1182 Zhou, T., Ross, D.G., Devito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure
1183 to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities
1184 in weanling rats. *Toxicol. Sci.* 61, 76–82. doi:10.1093/toxsci/61.1.76

1185 Zhou, X., 2010. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from
1186 global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *J. Androl.* 31, 235–43.
1187 doi:10.2164/jandrol.109.009266

1188 Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that
1189 acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and
1190 alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–
1191 612. doi:en.2004-1018 [pii]10.1210/en.2004-1018 [doi]

1192 Zoeller, R.T., Tan, S.W., 2007. Implications of research on assays to characterize thyroid
1193 toxicants. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 195–210. doi:10.1080/10408440601123578

1194 Zoeller, R.T., Tyl, R.W., Tan, S.W., 2007. Current and potential rodent screens and tests for
1195 thyroid toxicants. *Crit Rev Toxicol* 37, 55–95. doi:770421600
1196 [pii]10.1080/10408440601123461 [doi]

- 1197 Zoeller, T.R., 2010. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm.* 9, 28–40.
- 1198 Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E.,
1199 2009. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats.
1200 *Toxicol Sci* 107, 56–64. doi:kfn225 [pii]10.1093/toxsci/kfn225
- 1201

Troisième partie

VII. Criblage de la toxicité thyroïdienne médiée par l'induction d'enzymes hépatiques

A. Aperçu du mécanisme mis en jeu chez le rongeur

L'induction de tumeur thyroïdienne secondaire à l'augmentation, causée par l'exposition à un xénobiotique, du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes, est un phénomène toxicologique bien décrit chez le rongeur, en particulier chez le rat. Ce mécanisme est représenté schématiquement sur la figure 13, et sera détaillé par la suite. Le mécanisme mis en jeu est initié par l'induction de la transcription des gènes codants pour des enzymes hépatiques, dont les UDP-glucuronosyltransférases (UGT, ou UDP-GT). Ces dernières facilitent l'élimination biliaire des hormones thyroïdiennes par la conjugaison à un résidu uridine di-phosphate (UDP). L'augmentation de clairance des hormones thyroïdiennes qui en découle entraîne une diminution du rétrocontrôle négatif de ces hormones sur l'axe HPT, qui se traduit par une augmentation de la concentration circulante de TSH. Celle-ci engendre dans un premier temps une hypertrophie des cellules folliculaires thyroïdiennes, et, si l'augmentation de concentration de TSH perdure, une hyperplasie de ces mêmes cellules folliculaires et l'apparition d'une tumeur. Ce mode d'action est décrit pour de nombreux composés, dont le chef de file le phénobarbital, mais également la carbamazépine, la nifédipine, les composés polyhalogénés aromatiques, etc. (Capen, 1994; McClain et al., 1989).

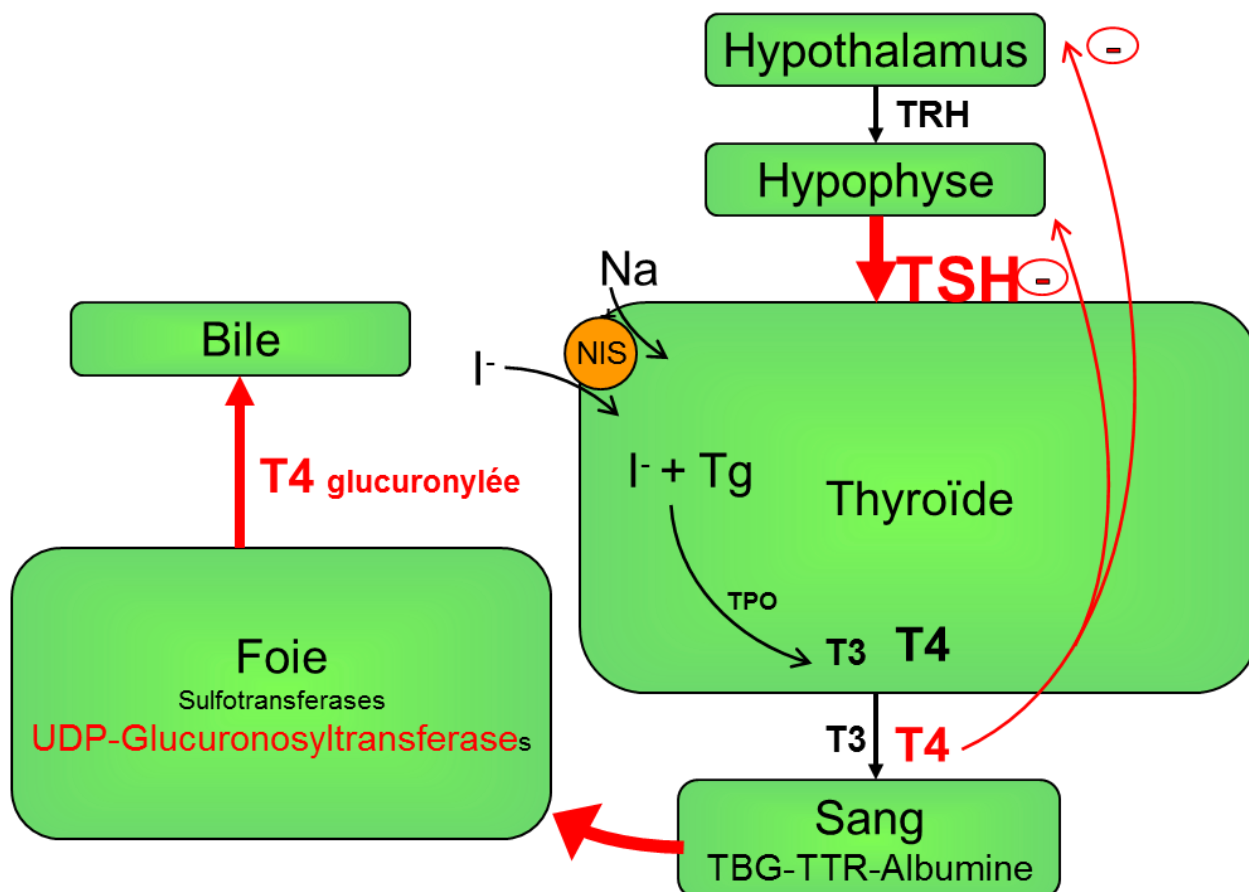


Figure VII-1. Mécanisme de toxicité vis-à-vis de la thyroïde des inducteurs d'enzymes hépatiques chez les rongeurs. D'après Klaassen et Hood, 2011.

B. Un mécanisme non extrapolable à l'homme

La mise en évidence d'un tel mécanisme d'action, dit de type "phenobarbital-like", a une importance particulière dans le cadre d'études de toxicologie menées sur rongeur dans le but d'anticiper des effets potentiels sur l'homme. En effet, ce type de mécanisme est considéré comme étant non extrapolable à l'être humain (Papineni et al., 2015). Les raisons de cette différence de sensibilité entre l'homme et le rongeur sont multiples :

- De nombreux inducteurs des enzymes hépatiques ont été étudiés chez l'homme, et ont montré une absence d'effet sur la concentration de TSH circulante (Meek et al., 2003). Il est à noter que parmi ces composés, le phénobarbital, un médicament utilisé chez l'Homme depuis les années 1930,

est classiquement utilisé dans le traitement de l'épilepsie pour ses propriétés anti convulsivantes. Il est également utilisé dans certains pays comme sédatif dans les états anxieux et plus rarement pour traiter les troubles du sommeil. Les données toxicologiques qui concernent l'être humain sont de ce fait particulièrement robustes, et les mécanismes mis en jeu extensivement étudiés. L'absence d'implication du médicament dans l'apparition de différents cancers a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques (McLean et al., 1992; Olsen et al., 1993) qui viennent appuyer son innocuité.

- Les enzymes de phase II induites responsables de l'augmentation de clairance hépatique des hormones thyroïdiennes bien que relativement proches, diffèrent entre l'homme et le rat. En particulier, les UGT responsables physiologiquement de la majeure partie de la conjugaison des hormones thyroïdiennes ne sont pas les mêmes dans les deux espèces (Bock, 2011; Kato et al., 2008).
- Le réservoir d'hormones thyroïdiennes est considérablement moins important chez le rongeur que chez l'être humain, ce qui rend le rat particulièrement sensible aux perturbations de l'axe HPT. En particulier le stock de thyroglobuline intra folliculaire humain est proportionnellement bien plus important que chez les rongeurs. L'être humain a en ainsi une grande capacité à tamponner, grâce à une synthèse *de novo* induite par la voie de signalisation de la TSH, les variations de concentration circulante des hormones thyroïdiennes (Dellarco et al., 2006).
- La demi-vie des hormones thyroïdiennes est bien plus courte chez le rat que chez l'être humain du fait de l'absence de thyroxine-binding globulin (la demi-vie de la T_4 est de 5 à 9 jours chez l'être humain, contre 0,5 à 1 jour chez le rat (Jahnke et al., 2004)). De ce fait, les variations de synthèse ou d'excrétion des hormones thyroïdiennes se traduisent plus vite par une variation des concentrations circulantes.

- La concentration circulante constitutive de TSH est plus élevée chez le rat que chez l'être humain, ce qui reflète une activité globale plus élevée de l'axe HPT (Finch et al., 2006; McClain et al., 1988).
- L'activation de la thyroïde qui résulte d'une augmentation de clairance hépatique de la T_4 est plus importante chez le rat que chez l'humain, ce qui se traduit par une histopathologie différente, caractérisée par une hypertrophie des cellules observée chez le rat, mais absente chez l'homme (McClain, 1995). Les cellules folliculaires sont en outre plus sujettes à l'hyperplasie en réponse à la stimulation par la TSH en comparaison avec ce qui se passe chez l'être humain, probablement du fait de la stimulation constitutive déjà très importante.
- L'incidence de tumeurs thyroïdiennes est relativement faible chez l'homme, alors que de telles tumeurs sont fréquemment observées dans les études de toxicité chronique chez le rat.

Pour ces différentes raisons, lorsque les causes directes de carcinogénicité sur la thyroïde ont été exclues par des études dédiées (*e.g.* test d'Ames, etc.), et lorsque l'approche mécanistique a pu déterminer l'augmentation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes comme évènement initiateur, l'observation de tumeurs thyroïdiennes chez le rat n'est pas extrapolable à l'homme.

C. La toxicité thyroïdienne médiée par le foie en détails

Le mécanisme d'action toxique des inducteurs des enzymes hépatiques vis-à-vis de la thyroïde chez les rongeurs est représenté schématiquement sur la figure VII-1.

Le premier évènement est l'induction d'enzymes hépatiques de phase II. Parmi elles, les UDP-GT sont les principales responsables de la conjugaison qui permet l'élimination des hormones thyroïdiennes par voie biliaire (McClain et al., 1989; Visser, 1996).

L'administration des différents inducteurs des enzymes hépatiques est connue pour augmenter l'efficacité de cette voie d'élimination. La démonstration de la mise en jeu de ce mécanisme a été faite initialement en mesurant la quantité d'hormone glucuronylée par des microsomes hépatiques obtenus à partir d'animaux exposés à différents inducteurs enzymatiques (Barter et Klaassen, 1992; Hood et al., 2003; Kato et al., 2008; Kato et al., 2010).

1. La réaction de glucuronidation

La glucuronidation ou glucuronoconjugaison, catalysée par les UGT, est la plus importante réaction de biotransformation de phase II. Les UGT sont impliquées dans la détoxification de composés endogènes comme la bilirubine, les stéroïdes, ou les hormones thyroïdiennes, et des xénobiotiques (*e.g.* hydrocarbures polycycliques carcinogènes, médicaments de toutes classes thérapeutiques, etc.). La réaction de glucuronoconjugaison a lieu entre une molécule hydrophobe, appelée aglycone, et le co-substrat de la réaction: l'acide UDP-glucuronique (UDP-GA). Les UGT catalysent le transfert de l'UDP-GA sur des structures chimiques possédant une fonction R-OH, R-COOH, R-CO, R-NH₂ ou R-SH. Les composés conjugués obtenus sont alors respectivement nommés O-glucuronides, C-glucuronides, N-glucuronides ou S-glucuronides. Le co-substrat de la réaction, l'UDP-GA, est synthétisé dans la cellule en 2 étapes. La 1^{ère} étape (1) est catalysée par l'UDP-glucose pyrophosphorylase qui, à partir de glucose-1-phosphate et d'uridine triphosphate (UTP), va former de l'UDP-glucose et du pyrophosphate. Lors de la 2^e étape (2), l'UDP-glucose va être oxydé en UDP-GA par une UDP-glucose déshydrogénase. L'activité de cette enzyme est contrôlée par le rapport NAD⁺/NADH (Chlouchi et al., 2007).



Ce transfert augmente sensiblement la polarité du substrat et par conséquent son hydrophilie, ce qui favorise son excrétion biliaire (Klaassen and Hood, 2011).

2. Les isoformes d'UGT impliquées

La mesure de l'activité induite des UDP-GT vis-à-vis de deux substrats, le 4-nitrophénol et la bilirubine, a initialement permis d'estimer l'amplitude de l'induction enzymatique, mais en ne visualisant que l'effet de certaines isoformes. Ces deux méthodes historiques sont largement utilisées pour estimer l'effet d'un produit sur l'élimination des hormones thyroïdiennes par voie biliaire. La bilirubine est un substrat très spécifique de l'UGT 1A1 (King et al., 2000). Le test correspondant donne ainsi un résultat très spécifique et ne renseigne pas sur l'induction des autres isoformes d'UGT. L'activité des microsomes hépatiques sur le paranitrophénol, si elle est fortement liée à l'UGT 1A6 (Chlouchi et al., 2007; King et al., 2000), semble cependant être moins exclusive que l'activité sur la bilirubine due presque uniquement à l'UGT 1A1 (Watkins et Klaassen, 1982). Les deux isoformes ciblées par ces tests sont désignées « T₄-UGT » dans un nombre important d'études chez le rat et la souris car elles sont souvent considérées comme seules responsables de la conjugaison de cette hormone (Kato et al., 2005; Qatanani et al., 2005; Visser, 1996).

La biologie moléculaire a permis caractériser plus précisément les inductions d'enzymes hépatiques en identifiant les isoformes d'UGT spécifiquement induites par différents inducteurs et d'identifier différents événements moléculaires initiateurs de ces inductions. Dans le foie, l'induction de la transcription des gènes codants pour les UGT par les xénobiotiques semble être médiée en majeure partie par les récepteurs nucléaires CAR/PXR (Constitutive androstane receptor / Pregnane X receptor) et Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2) (Shelby and Klaassen, 2006). Les composés considérés "Phenobarbital-like" sont classiquement des inducteurs CAR/PXR.

Il existe une différence de pool d'UGT chez les rongeurs et les êtres humains. Mackenzie a illustré en 2005 le fait que les rongeurs, et particulièrement le rat et la souris, ont des isoformes d'UGT très proches phylogénétiquement qui sont assez éloignées des isoformes humaines (Mackenzie et al., 2005). En outre, la thyroxine humaine est principalement conjuguée par les UGT 1A1 et 1A3 (Kato et al., 2008), ce qui diffère du rongeur chez qui la conjugaison implique les UGT 1A1, 1A6 et 2B1 (Bock, 2011). Ces

différences pourraient ainsi contribuer au fait que les inducteurs d'enzymes hépatiques, pourtant inducteurs des UGT chez l'homme n'ont pas le même effet sur les hormones thyroïdiennes circulantes que chez le rongeur, et qu'ils n'ont donc pas la même toxicité.

3. L'induction des enzymes hépatiques à l'origine de l'activation de l'axe HPT

L'induction de ces enzymes de phase II résulte en une augmentation franche de la clairance de la T₄ (Kato et al., 2010). La diminution de la concentration plasmatique qui en découle induit une diminution du rétrocontrôle négatif de l'hormone sur l'hypothalamus et l'hypophyse, ce qui est cohérent avec l'augmentation de concentration de TSH plasmatique observée chez le rat et la souris, par exemple après l'administration de phénobarbital (Hood et al., 2003; Klaassen et Hood, 2001).

La stimulation de la thyroïde par la TSH engendre l'hypertrophie et la prolifération des cellules folliculaires chez le rat (Klaassen et Hood, 2001) et la souris (Hood et al., 2003). C'est ce mécanisme d'action qui est fortement suspecté d'être à l'origine des tumeurs thyroïdiennes induites par les inducteurs des enzymes hépatiques chez le rat (Klaassen and Hood, 2011; Rouquié et al., 2014).

D. Quel modèle pour le criblage des substances « Phenobarbital-like » ?

L'analyse du mécanisme d'action impliqué dans l'apparition de tumeurs thyroïdiennes chez le rat suite à l'administration d'inducteurs des enzymes hépatiques montre qu'il est possible d'être alerté au sujet de sa probable mise en œuvre sans attendre l'apparition de tumeur. En effet, l'induction dans le foie de la transcription des gènes codant pour les isoformes d'UGT responsables de la conjugaison des hormones thyroïdiennes constitue en elle-même l'évènement initiateur du mécanisme de toxicité de type « phenobarbital-like ». De telles inductions par le phénobarbital sont facilement observables *in vivo* au moyen d'études court terme chez le rat, de l'ordre de 4 jours à une semaine (tableau VI-1), et par le pregnenolone 16 -carbonitrile (PCN) dans des conditions similaires (Al Khansa et al., 2010; Shelby and Klaassen, 2006; Vansell and Klaassen, 2002). En revanche,

le moyen de détection précoce *in vitro* de la capacité d'une substance d'essai à induire un mécanisme de type "phenobarbital-like" est encore à développer.

Les modèles cellulaires compatibles à la fois avec l'étude de l'induction des enzymes hépatiques et avec une manipulation en routine sont rares. A l'heure actuelle, seuls les hépatocytes cryopréservés semblent en capacité de répondre à une telle problématique. Parmi les différents hépatocytes primaires de rat disponibles sur le marché, le modèle Liverbeads (des hépatocytes primaires cryopréservés inclus dans des billes d'alginate) s'est démarqué de par sa facilité d'utilisation, sa disponibilité, et de par le travail engagé par Al khansa et al. (Al Khansa et al., 2010). En effet, il a été montré que le modèle Liverbeads™ est en mesure de reproduire *in vitro* l'induction des UGT 1A6 et 2B1 qui se produit *in vivo* chez le rat après 6 jours de traitement par le phénobarbital ou le PCN (Fig.VII-2).

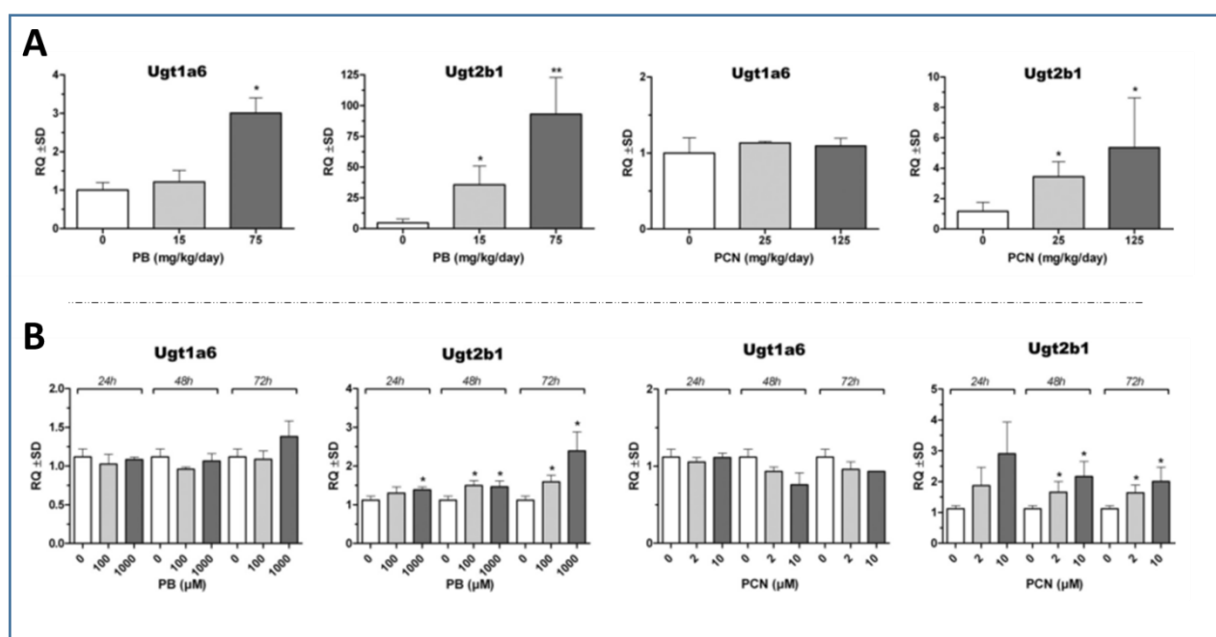


Figure VII-2. Effet du phénobarbital et du PCN sur l'induction des UGT 1A6 et 2B1 dans le foie de rats (A) et dans les Liverbeads (B). Les groupes de rats comprennent 5 individus chacun, et les expérimentations sur Liverbeads ont été réalisées en triplicats. Les valeurs sont celles des moyennes \pm SD. Pour chaque temps et concentration ou groupe de dose, la comparaison a été faite avec le groupe contrôle correspondant. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$. D'après (Al Khansa et al., 2010).

Il est tout de même à noter, dans l'étude de Al Khansa et al., une différence d'induction de l'UGT 1A6 par le phénobarbital entre le modèle *in vivo* et le modèle *in vitro*. L'analyse de littérature résumée par le tableau VII-1 montre que la différence observée se retrouve entre études *in vivo* selon les designs d'étude. Seule la moitié des études sélectionnées lors desquelles a été testée l'induction de l'UGT 1A6 en a confirmé la survenue. En outre, la corrélation entre les résultats obtenus *in vivo* et ceux obtenus sur Liverbeads en ce qui concerne l'induction d'une sélection de cytochromes P450 est également très bonne.

Mais pour qu'un tel modèle d'hépatocytes inductibles ait un intérêt dans le cadre de la toxicologie, il est nécessaire qu'il réagisse différemment aux inducteurs enzymatiques « phenobarbital-like », par rapports aux composés non toxiques vis-à-vis de la thyroïde, ou aux toxiques thyroïdiens dont le mécanisme n'est pas médié par le foie. Le travail expérimental réalisé dans le cadre de cette thèse a ainsi eu pour objet d'évaluer le modèle Liverbeads quant à sa capacité à discriminer les composés inducteurs des UGT hépatiques des composés non inducteurs de ces mêmes UGT.

Table VII-1. : Résultat de la revue de littérature sur l'induction des UGT hépatiques chez le rat par le phénobarbital.

Revue de littérature sur l'induction des UGT hépatiques par le phénobarbital chez le rat				
référence	Espèce & traitement	Isoformes non induites	Isoformes induites	Technique
(Bock and Bock-Hennig, 2010)	Sprague-Dawley mâle, 100 mg/kg, ip unique	UGT 1A6 (x0,66): 4-NP activity	UGT 2B1?: Chloramphenicol activity (x2)	Activité enzymatique
(Kato et al., 2010)	Wistar mâle, 4 jours 80mg/kg, ip		UGT 1A1, 1A6	Western blot
			UGT 2B1	
(Shelby and Klaassen, 2006)	Sprague-Dawley mâle, 4 jours 80mg/kg, ip	UGT 1A: 1-2-3-5-6-7-8 UGT 2B: 2-3-6-8-12	UGT 2B1 (x4) (gène UDPGTR2)	Branched DNA Signal Amplification Assay
(Ejiri et al., 2005)	Femelles gestantes F344, 13 to 16 jours 80mg/kg, ip		UGT 1A1 (x1,7)	Analyse microarray
			UGT 2B1 (x3), 2B12 (x1,8)	
(Kato et al., 2005)	Wistar mâle, 4 jours 80mg/kg, ip		UGT 1A1 (x1,7), 1A6 (x4)	Western blot
			UGT 2B1 (x12)	
(Ganem and Jefcoate, 1998)	Femelles F344 & WF, 3 jours 60mg/kg, ip		UGT 2B1	Northern blot
(Coffman et al., 1996)	Wistar mâle, 4 jours 80mg/kg, ip		UGT 1A1 protein	Chromatographie & photoaffinity labeling
			UGT 2B1 protein	
(Barter and Klaassen, 1992)	Sprague-Dawley mâle, 4 jours 75 mg/kg/jour, ip	UGT 1A1: activité bilirubine (brij58)		Activité enzymatique
(Koster et al., 1986)	Wistar mâle, injection 100mg/kg ip suivie de 0,1% dans l'eau de boisson pendant 4 jours		UGT 1A1: activité bilirubine (x1,5 digitonin)	Activité enzymatique

Revue de littérature sur l'induction des UGT hépatiques chez le rat par le phénobarbital				
référence	Espèce & traitement	Isoformes non induites	Isoformes induites	Technique
(Tavoloni et al., 1983)	Sprague-Dawley mâle, 6 jours 1-3mg/kg ip		UGT 1A1: Bilirubin activity (x1,3, x1,5 with digitonine 1,7 with deoxycholate)	Activité enzymatique
			UGT 1A6: 4-NP activity (x1,5, x1,7 with UDPNAG, x1,5 with deoxycholate)	
(Watkins and Klaassen, 1982)	Wistar (Sexe ?), 4 jours 75 mg/kg/jour ip	UGT 1A1: Bilirubin activity (brij58)	UGT 2B1?: Chloramphenicol & Morphine activities (brij58)	Activité enzymatique
		UGT 1A6: 4-NP activity (brij58)		
(Vainio and Hietanen, 1974)	Femelles Wistar de 2 mois, 2 semaines po 0,025% dans l'eau de boisson	UGT 1A1: Bilirubin activity (without detergent activation)	UGT 1A1: Bilirubin activity (x2 with trypsin)	Activité enzymatique
			UGT 1A6: 4-NP activity (x1,8, x3 with trypsin)	
(Jansen and Henderso n, 1972)	Wistar Mâle, 12 jours 20 à 40mg/kg parentéral		UGT 1A1: Activité bilirubine (x2,8) UGT 1A6: Activité 4-NP (x3)	Activité enzymatique

E. Etude de la pertinence du modèle Liverbeads pour la détection des composés « Phenobarbital-like »

Cette étude a été conçue comme le continuum de l'étude décrite par Al Khansa *et al.* La démonstration de la capacité des Liverbeads à reproduire les inductions des UGT observées *in vivo*, le comportement du modèle exposé à des composés connus pour être non toxiques pour la thyroïde, ou pour être toxiques pour la thyroïde par un mécanisme indépendant des enzymes hépatiques. Dans le but de tester le modèle Liverbeads dans le cadre d'une utilisation parallèle avec le modèle PCCl3 décrit précédemment, les molécules utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour tester la lignée cellulaire PCCl3. Ainsi, les

composés non toxiques vis-à-vis de la thyroïde sélectionnés sont le céfuroxime (CEF), l'atrazine (ATZ), et l'iprodione (IPR). Les toxiques thyroïdiens testés sont le méthimazole (MMI), le propylthiouracyle (PTU), et le perchlorate (PER). Afin de disposer d'un ancrage entre l'étude de Al Khansa et al, les Liverbeads ont également été exposés au phénobarbital (PB).

1. Matériel et méthodes

Substances d'essai. PB, MMI, PTU, PER, CEF, ATZ, et IPR, et le dimethyl sulfoxyde (DMSO) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Les milieux de culture Leibovitz L-15 (L-15) et HepatoZYME-SFM comme le sérum fœtal de veau (FCS) ont été achetés chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Tous les produits utilisés sont de la meilleure qualité disponible.

Culture cellulaire et traitement. Des Liverbeads cryopréservés de rat Wistar ont été achetés à Biopredic International (Rennes, France) et mis et maintenus en culture selon les instructions du fournisseur. En bref, les Liverbeads ont été rapidement décongelés et placés à 37°C, puis mis dans le milieu L-15 contenant 0.6 M glucose, 10 mM Hepes, 100 IU/ml pénicilline, et 100 µg/ml streptomycin, puis ont été placés pendant 3h en plaques 12 puits (0.2 mL de billes dans 1mL de milieu par puits) dans le milieu HepatoZYME-SFM contenant 10% de FCS 4 µg/ml insulín, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml pénicilline, et 100 µg/ml streptomycine à 37°C dans 5% CO₂ / 95% air. Ce milieu a été remplacé avec le même milieu supplémenté avec 1 µM hydrocortisone hemisuccinate, sans FCS, contenant les différentes substances d'essai ou le véhicule seul (DMSO 0.2%) pendant 48 ou 72h. Les concentrations en substance d'essai ont été les plus élevées possibles, en fonction de leur solubilité et de leur cytotoxicité déterminée lors d'une étude préliminaire.

Analyse qPCR et analyse statistique. Les analyses qPCR et statistiques ont été réalisées telles que décrites précédemment.

2. Résultats

Au vu des résultats de Al khansa et al, il apparait que les Liverbeads nécessite un certain temps d'exposition avant de montrer des inductions enzymatiques d'amplitude suffisante pour être statistiquement significative après exposition au phénobarbital ou au PCN (Fig. VII-3). Ainsi, seuls les temps d'exposition longs, de 48 et 72h, ont été utilisés dans cette étude. Les trois isoformes d'UGT du point de vue de la métabolisation des hormones thyroïdiennes, UGT 1A1, 1A6, et 2B1, ont été considérées pour l'analyse.

Les Liverbeads exposés au phénobarbital ont vu l'UGT 2B1 induite de façon dépendante de la dose d'exposition, à 48 et 72h (Fig.VII-4). Les deux autres UGT testées n'étant ni induites ni réprimées par l'exposition au phénobarbital.

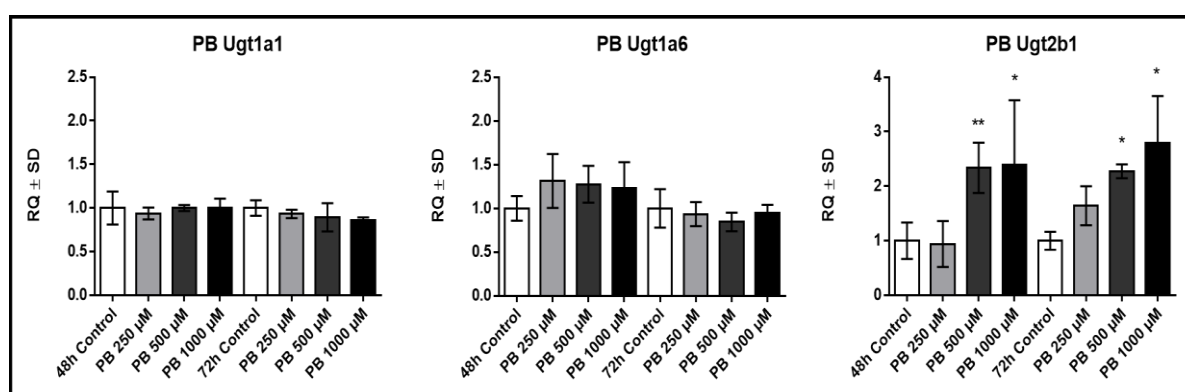


Figure VII-3. Effet du phénobarbital (PB) sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats. Les expérimentations sur Liverbeads ont été réalisées en triplicatas, sur 48 et 72h. Les valeurs sont celles des moyennes \pm SD. Pour chaque temps et concentration ou groupe de dose, la comparaison a été faite avec le groupe contrôle correspondant. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. L'exposition des Liverbeads au PB, a entraîné une induction significative selon une relation dose-effet, de l'isoforme UGT2B1.

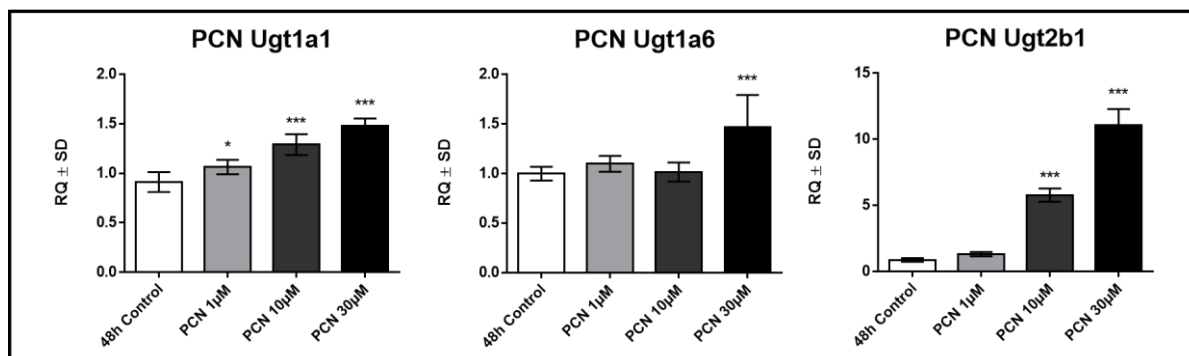


Figure VII-4. Effet du PCN sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats. Les expérimentations sur Liverbeads ont été réalisées en triplicatas sur 72h. Les valeurs sont celles des moyennes \pm SD. Pour chaque temps et concentration ou groupe de dose, la comparaison a été faite avec le groupe contrôle correspondant. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$. L'exposition des Liverbeads au PCN, a entraîné une induction significative selon une relation dose-effet, des isoformes UGT 1A1 et 2B1, et une induction significative de l'isoforme 1A6 à forte dose.

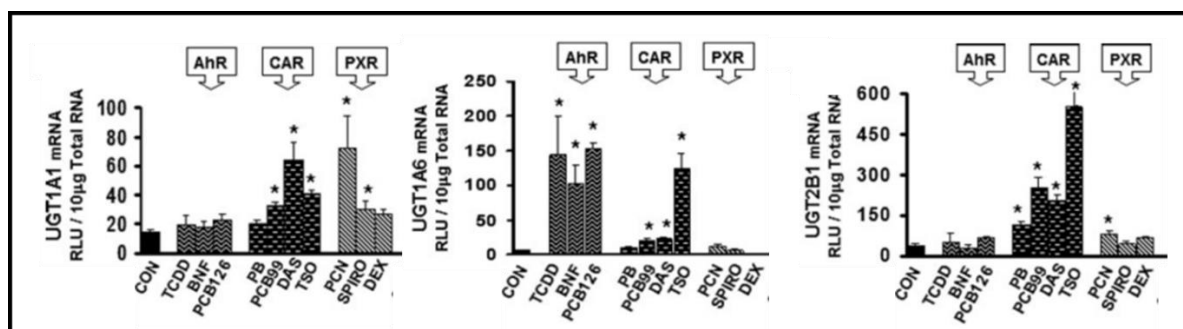


Figure VII-5. Données de littérature concernant l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1, par le phénobarbital et le PCN chez le rat. D'après (Shelby and Klaassen, 2006).

L'exposition aux composés réputés non toxiques vis-à-vis de la thyroïde a donné lieu à une induction assez peu importante quantitativement, soit un facteur d'induction de 1,3, mais significative de l'UGT 2B1 par l'iprodione (Fig.VII-6). Cette induction n'apparaît qu'à forte dose au temps 48h, sans que l'on observe de relation dose-effet. L'exposition des Liverbeads au céfuroxime semble provoquer la diminution de l'expression de l'UGT 2B1 à 48 et 72 h. En effet, même si la diminution n'est significative que pour la dose intermédiaire de 500 μ M, on observe à 48 et 72h une tendance à la diminution de l'expression selon une

relation dose effet (non. Des résultats comparables ont été obtenus pour l'UGT 1A1 après l'exposition des Liverbeads à l'iprodione. Dans ce cas, la diminution d'expression n'est significative que pour la forte dose à 72h.

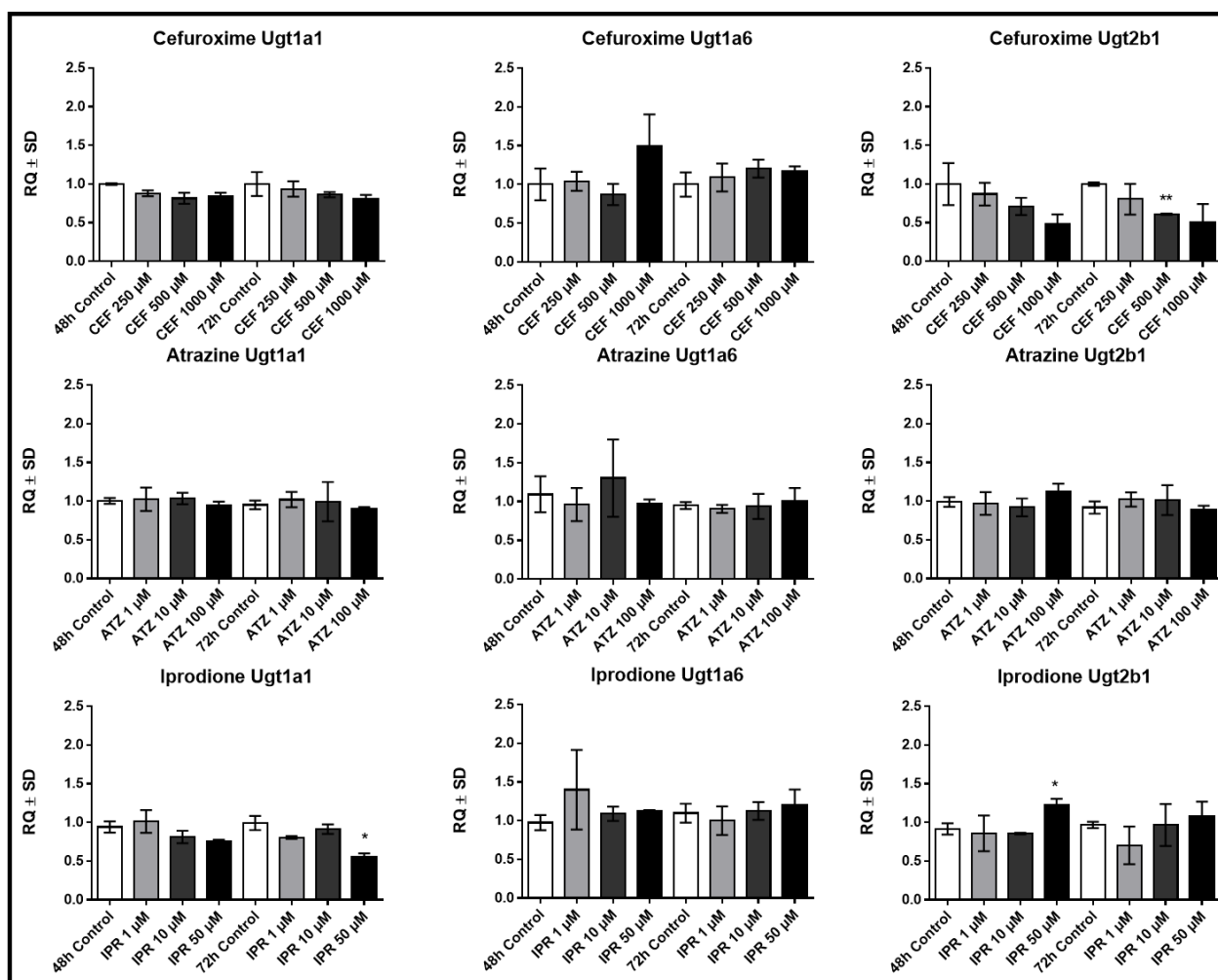


Figure VII-6. Effet du céfuroxime, de l'atrazine, et de l'iprodione, sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats. Les expérimentations sur Liverbeads ont été réalisées en triplicatas, sur 48 et 72h. Les valeurs sont celles des moyennes \pm SD. Pour chaque temps et concentration ou groupe de dose, la comparaison a été faite avec le groupe contrôle correspondant. *, $p < 0.05$.

L'exposition des Liverbeads aux trois composés connus pour être des toxiques thyroïdiens directs n'a donné lieu à aucune modification significative de l'expression des trois isoformes d'UGT étudiées. En outre, il n'a été observé de tendance particulière commune aux deux temps d'exposition pour aucun de ces toxiques thyroïdiens directs

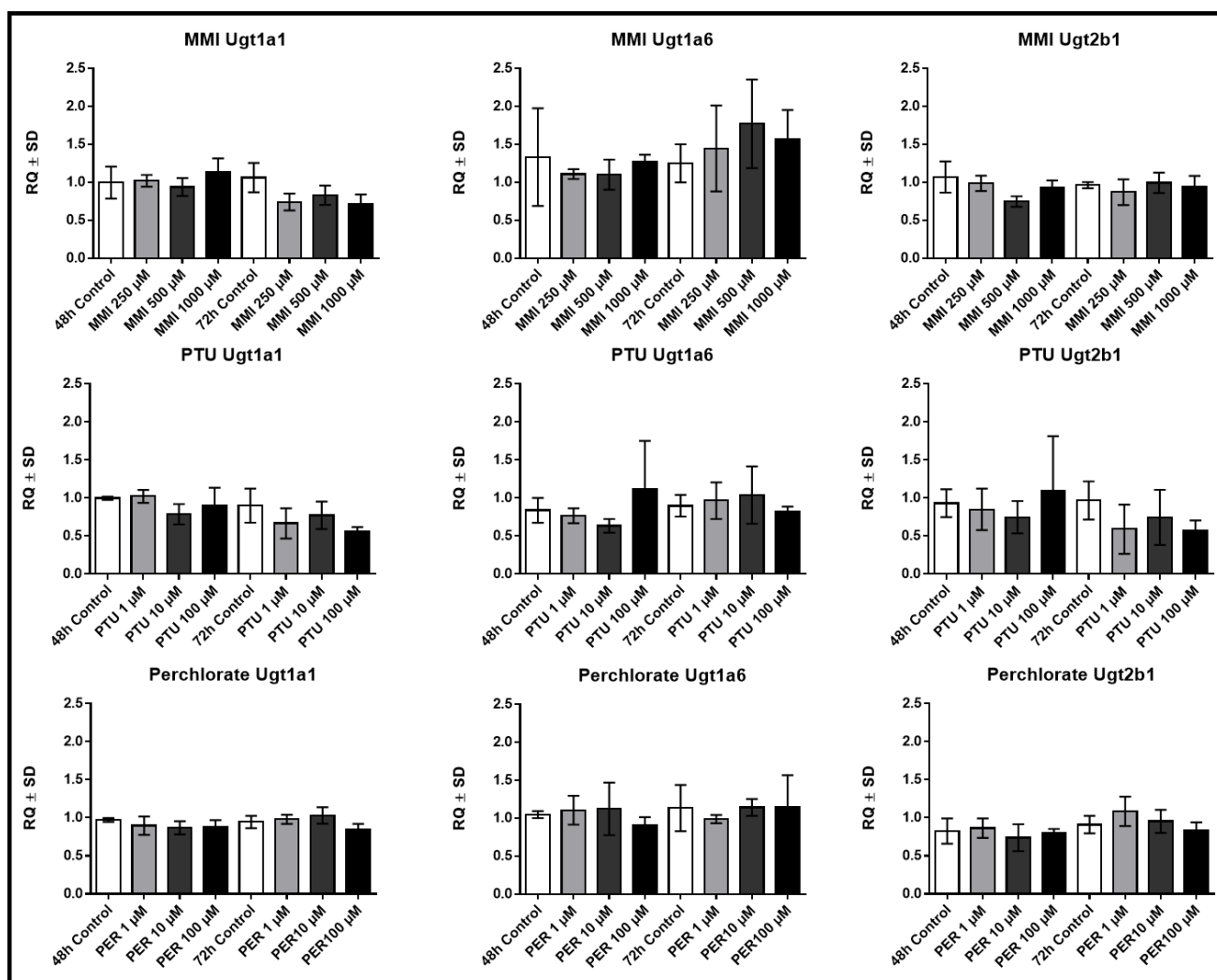


Figure VII-7. . Effet du MMI, du PTU, et du perchlorate, trois toxiques thyroïdiens directs, sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 dans les Liverbeads de rats. Les expérimentations sur Liverbeads ont été réalisées en triplicatas, sur 48 et 72h. Les valeurs sont celles des moyennes \pm SD. Pour chaque temps et concentration ou groupe de dose, la comparaison a été faite avec le groupe contrôle correspondant. *, $p < 0.05$.

3. Discussion

a. Un modèle robuste

L'étude des transcrits des Liverbeads exposés au phénobarbital confirme celle réalisée par Al Khansa *et al*, puisque l'évènement caractéristique de la mise en jeu du mécanisme à l'origine de tumeurs thyroïdiennes, c'est-à-dire l'induction de l'enzyme UGT 2B1, a parfaitement été reproduit. En outre, la mise en parallèle des résultats *in vitro*

d'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1 relevés dans la littérature (tableau VII-1 & Fig VII-2 et VII-5) avec les résultats obtenus avec le modèle Liverbeads exposés au PCN et au phénobarbital montre une bonne adéquation entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*. La seule différence notable de résultat concerne l'induction de l'UGT 1A6 observée dans la présente étude après exposition des Liverbeads au PCN, alors que cela n'a pas été observé par Al khansa *et al.*, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, une telle induction obtenue uniquement pour la forte dose, est en accord avec les résultats de Shelby et Klaassen qui ont observé une tendance non significative à l'induction de la transcription de l'UGT 1A6 par le PCN chez le rat (Fig.VII-4). Les inductions d'UGT par le PCN et le PB ont donc été reproduites à plusieurs années d'intervalle, par des opérateurs différents. Ces inductions sont fidèles aux observations faites *in vivo* reportées dans la littérature.

b. Une bonne valeur prédictive

Les trois composés non toxiques vis-à-vis de la thyroïde sélectionnés (CEF, ATZ, et IPR) n'ont dans l'ensemble pas induit la transcription des UGT responsables de la conjugaison des hormones thyroïdiennes. La seule donnée qui entre en contradiction avec cela concerne l'induction de l'UGT 2B1 secondaire à l'exposition à l'iprodione, uniquement à forte dose, et sans qu'une relation dose-effet ne soit perceptible. En outre, l'induction observée est de faible intensité en comparaison avec l'induction de la même isoforme par le phénobarbital ou par le PCN. Le facteur d'induction par l'iprodione observé est de 1,3, alors qu'il est respectivement d'environ 5 et 2,5 après expositions au PCN et au phénobarbital (Fig. VII-2, VII-3, et VII-5). On peut donc supposer que cette induction isolée et de faible intensité est artéfactuelle.

Les trois composés toxiques directs pour la thyroïde (MMI, PTU, et PER) étaient également attendus comme inactifs sur les Liverbeads. Cette hypothèse a été vérifiée pour les trois produits. Ainsi, aucun des six composés supposés ne pas induire de mécanisme d'induction hépatique de type « phenobarbital-like » n'a induit les UGT sélectionnées pour leur pertinence dans l'initiation de ce mécanisme.

4. Conclusion

Par ces investigations complémentaires à celles initiées par Al Khansa *et al*, nous avons par la présente étude confirmé la pertinence du modèle Liverbeads dans la détection et l'identification de composés de type « phenobarbital-like ». Nous avons également confirmé, grâce aux essais d'exposition des Liverbeads à des composés toxiques directs pour la thyroïde (MMI, PTU, et PER), la capacité du modèle à identifier le type de mécanisme impliqué (*i.e.* direct ou médié par le foie) en cas d'observation de tumeur de la thyroïde *in vivo* chez le rat. Une étude à plus large échelle d'exposition des Liverbeads à de nombreux inducteurs enzymatiques, toxiques thyroïdiens, et composés non toxiques pour la thyroïde, serait à envisager et permettrait de prétendre à proposer un test de screening basé sur ce modèle. Un tel test serait pertinent dans le cadre d'une batterie de tests *in vitro* de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne.

VIII. Discussion Générale

La détection de perturbateurs endocriniens qui ciblent la thyroïde est une des préoccupations croissantes en toxicologie en raison des enjeux de santé publique, mais également du défi technique que cela constitue pour le toxicologue. La carence actuelle en tests pour la détection de tous les mécanismes d'action décrits impliqués dans la perturbation de la fonction thyroïdienne, conduit probablement à ne pas identifier et définir certains contaminants environnementaux en tant que PE. Il est ainsi envisageable que les scénarii utilisés jusqu'à présent minorent l'évaluation du risque sanitaire représenté par la perturbation de la fonction thyroïdienne (Bergman et al., 2012; INSERM, 2008). L'amélioration des connaissances relatives aux perturbations de l'axe HPT implique d'utiliser une batterie de tests de criblage plus pertinents et à visée plus large ciblant les différents mécanismes d'action. Ce type d'approche nécessite une révision des procédures préconisées pour le criblage *in vitro* des effets toxiques des perturbateurs thyroïdiens, puisque actuellement la conduite des nombreux tests disponibles permet seulement d'obtenir une réponse partielle à ces effets. Par ailleurs, dans le contexte du développement industriel de molécules manufacturées, la détection et l'investigation mécanistique de la perturbation de l'axe HPT a nécessité jusqu'à présent d'avoir recours au modèle animal dès l'initiation du travail de recherche. Les études conduites en routine impliquent l'utilisation d'un nombre conséquent d'animaux dans des études relativement longues, dont la phase d'exposition a une durée de l'ordre du mois, alors que le contexte sociétal pousse à réduire et optimiser l'expérimentation animale.

A. Études *in vivo* court terme sur rat, un modèle utilisable en routine ?

I. En comparaison avec les études *in vivo* actuellement utilisées en routine, menées sur rats pubertaires mâles et femelles, exposés par voie orale à des doses répétées de molécule exogène, la proposition de conduire une étude uniquement sur rats mâles, pour une durée d'exposition courte de seulement 7 jours apparaît du plus grand intérêt à la fois d'un point de vue (i) éthique : réduction du nombre d'animaux utilisés lors de cette expérimentation ainsi que réduction des coûts imposés à l'animal en termes de souffrance par une diminution de la durée d'exposition et (ii) économique : réduction des coûts financier pour les mêmes raisons que celles énoncées précédemment.. Nous avons montré (article 1) que ce format d'études permet de cribler les molécules chimiques à toxicité directe sur la thyroïde, dès lors que des évènements initiateurs recensés mènent à la perturbation de l'axe HPT. Pour une utilisation optimale en routine, il serait opportun d'étendre l'étude à la détection des autres mécanismes initiateurs de la perturbation de la fonction thyroïdienne. La toxicité thyroïdienne médiée par le foie *via* l'induction des UGT chez les rongeurs est également un mécanisme à prendre en compte, tout comme le déplacement des hormones thyroïdiennes de leurs sites de liaison aux protéines de transport sanguin ou la dérégulation de leur déiodation périphérique.

1. Un nouvel outil pour la détection des PE toxiques directs vis-à-vis de la thyroïde

II. Grâce aux travaux présentés dans cette thèse, nous avons la confirmation que la biologie moléculaire appliquée à des études d'exposition de courte durée sur rat permet d'identifier rapidement, avec des moyens de laboratoire standard, les toxiques thyroïdiens directs. La démonstration en a été faite au moyen de huit composés, toxiques pour la thyroïde et de deux composés PE *via* d'autres mécanismes que la perturbation de l'axe HPT. La mesure de l'expression d'une sélection de gènes permet à la fois la détection de ces toxiques et une meilleure compréhension des mécanismes d'action impliqués, grâce à la bonne corrélation établie entre les profils d'expression de gènes et ces mécanismes (article 1). L'outil est donc

prometteur, et son intérêt en termes de détection rapide des PE et des mécanismes d'action qu'ils impliquent est important.

III. Il reste néanmoins à confirmer la fiabilité d'un tel type de test, basé sur des études telles que décrites précédemment, en évaluant en particulier les valeurs prédictives positive et négative. La finalité principale de ces tests étant le criblage précoce, il serait pertinent d'envisager les mettre en place en routine. Ainsi, l'obtention de profils de transcription comparables à ceux obtenus avec les composés non actifs sur l'axe HPT stoppe toute investigation complémentaire pour une évaluation et validation des effets toxiques au niveau thyroïdien. Dans ce contexte, l'étude toxicologique peut être poursuivie selon la chronologie habituelle (Fig.IV-1). En revanche, l'obtention de profils de transcription comparables à ceux obtenus après exposition aux toxiques thyroïdiens oriente préférentiellement vers un profil toxicologique de type perturbateur de l'axe HPT. Dans ce cas, des investigations complémentaires sont conduites pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Ces investigations complémentaires peuvent se faire à l'aide de tests *in vitro* dans le cas de l'obtention d'un profil caractéristique d'un évènement moléculaire initiateur particulier (e.g. : une inhibition de la TPO), de tests *in vivo* de plus longue durée d'exposition spécifiquement conduits pour caractériser l'atteinte sur l'axe HPT, ou simplement par la conduite en priorité de tests de détection de la perturbation de l'axe HPT, habituellement effectués plus tard dans le développement. Dans le cas d'une alerte autant que dans celui d'une absence d'alerte, tous les résultats des tests de criblage précoce, destinés en priorité à alerter sur une propriété toxique potentielle, sont réévalués lors des études ultérieures à visée davantage mécanistique.

Une fois la preuve de concept posée, il n'est pas nécessaire de poursuivre la caractérisation de ce type de test au moyen de molécules au profil toxicologique connu. Le fait de tester en routine des molécules inconnues permettra à terme de constituer une base de données de profils de transcriptions, et de définir des valeurs prédictives positives et négatives relative au degré de toxicité de ces molécules vis-à-vis de la thyroïde.

2. Toxicité thyroïdienne médiée par le foie

Le format d'études d'exposition orale répétée de rats mâles sur une courte durée n'a pas été choisi au hasard pour la détection de la toxicité directe sur la thyroïde. Ce type d'études est utilisé depuis longtemps pour l'étude des composés inducteurs enzymatiques à l'origine de tumeurs thyroïdiennes chez le rongeur (Tableau VII-1). Des études portant sur différents inducteurs enzymatiques, dont le phénobarbital, de format très proche de celui utilisé dans nos travaux, ont montré qu'après 7 jours d'exposition des rats l'induction de la transcription des gènes codant pour les UGT responsables de la glucuronidation des hormones thyroïdiennes est observée (Shelby and Klaassen, 2006; Vansell and Klaassen, 2002).

L'ensemble des données de la littérature relative à l'induction des UGT par les toxiques thyroïdiens directs étudiés au cours de nos travaux, combiné à l'analyse des masses des foies de rats mesurés lors des autopsies (Article 1, tableau V-3), permet de poser l'hypothèse que des études de 7 jours pourraient permettre d'identifier parmi les toxiques thyroïdiens ceux dont l'action est médiée par une induction des UGT hépatiques. D'une part, il n'est pas attendu qu'une exposition aux toxiques thyroïdiens directs conduise à de telles inductions, ni augmentation de l'activité enzymatique des UGT vis-à-vis des hormones thyroïdiennes. Il a en effet été déjà rapporté que le traitement oral durant 7 jours de rats Sprague-Dawleys avec 10 mg/kg/jour de PTU ou de MMI ne conduit à aucun changement de l'activité T₄-UGT de microsomes hépatiques (De Sandro et al., 1992). De la même manière, le traitement oral durant 14 jours de rats mâles Crl-CD avec 10 mg/kg/jour de PTU ou jusqu'à 100 mg/kg/jour de Nal n'a pas modifié l'activité p-nitrophénol de microsomes hépatiques, tandis qu'elle était multipliée par trois dans le groupe de traitement par le phénobarbital de la même étude (Glatt et al., 2005). D'autre part, la littérature confirme largement que l'induction de la transcription des gènes codant pour les UGT s'accompagne d'une augmentation marquée de la masse du foie chez le rat (Craft et al., 2002; Glatt et al., 2005; Vansell, 2002; Watkins and Klaassen, 1982). Or dans notre étude, seul le traitement par l'IOF a induit une augmentation modérée de 12% de la masse du foie. Il est intéressant de noter

que Glatt et al. (2005) ont pu montrer après 14 jours d'exposition des rats à 10 mg/kg/jour de NaI une augmentation de la masse du foie sans variation de l'activité p-nitrophénol des microsomes hépatiques. L'IOF étant supposé agir sur la thyroïde par un relargage d'iode en excès, il est peu probable que l'augmentation de la masse hépatique observée dans notre étude soit associée à une augmentation de la transcription des gènes codant pour les UGT.

IV. Dans ce contexte, une exposition des rats durant 7 jours à des toxiques thyroïdiens directs a peu de probabilité de conduire à une augmentation de la transcription des gènes codant pour les UGT. Les toxiques thyroïdiens directs pourraient alors être distingués de ceux dont l'action chez le rat est médiée par la voie hépatique, par la mesure dans le foie de l'augmentation des transcrits spécifiques des UGT.

3. Perturbations des transports transmembranaires et sanguins des hormones thyroïdiennes et interactions avec les déiodinases

Si certains xénobiotiques tels le PTU ou l'acide iopanoïque sont décrits comme inhibiteurs des activités déiodinases, il apparaît peu pertinent de chercher à identifier la présence de ce type de mécanisme au stade du criblage. Chez les mammifères, environ 80% de la T_3 circulante est issue de la déiodination périphérique de la T_4 (St Germain et al., 2009). Le ratio T_4 / T_3 circulante est un bon reflet du niveau de déiodination périphérique qui dépend à la fois du transport transmembranaire des hormones et de l'activité métabolique des déiodinases. Sa détermination semble être plus pertinent au stade du criblage en comparaison avec la combinaison de tests spécifiques à ces deux mécanismes, tous deux délicats à mettre en œuvre (Zoeller et al., 2007).

S'il est avéré que certains xénobiotiques ont la faculté de déplacer la T_4 du transporteur sanguin TTR (Brouwer et al., 1998; Chauhan et al., 2000), l'existence de conséquences toxiques liées à la perturbation du transport sanguin des hormones thyroïdiennes demeure une hypothèse. Cependant, même si le criblage de ce mode d'action toxique est recommandé (OECD, 2014), il apparaît difficile de le réaliser en routine lors d'études 7 jours sur rats, telles que décrites ici du fait des difficultés d'isolement des

protéines concernées et du peu d'information apportée compte tenu du fait que les hormones thyroïdiennes sont dosées.

4. Bilan

Les études d'exposition répétée de rats par voie orale sur 7 jours est un modèle prometteur qui parvient à cribler l'ensemble des mécanismes de perturbation de l'axe HPT décrits. La combinaison de l'examen macroscopique de la thyroïde et du foie, de la mesure des concentrations de TSH, T₃ et T₄ circulantes, et de la mesure de transcrits dans la thyroïde et le foie est rapide, peu coûteuse et peu consommatrice de main d'œuvre, elle permet par ailleurs un criblage complet. Un autre avantage, qui reste à confirmer, concerne les indications précoces relatives à l'évènement moléculaire initiateur du phénomène toxique détecté.

B. Identification d'une combinaison de modèles d'étude *in vitro* de la perturbation de la fonction thyroïdienne

Il apparaît du plus grand intérêt de privilégier toute alternative à l'expérimentation animale pour des raisons éthiques et réduire le temps et le coût de mise en œuvre de toute expérimentation, aussi les tests de criblage de première intention sont idéalement des tests *in vitro*. Dans le cas de la détection des PE ciblant l'axe HPT, non seulement les mécanismes d'action à cribler sont nombreux, mais ils sont supportés par différents organes, ce qui rend illusoire l'idée d'utiliser un unique test *in vitro* de criblage. Comme cela a été très récemment recensé dans un rapport d'experts de l'OCDE (OECD, 2014), il existe un grand nombre de tests *in vitro*, chacun susceptible de cribler un évènement initiateur de la perturbation de l'axe HPT, à différents stades de développement. En revanche, tous les mécanismes connus ne sont pas couverts par chacun des tests existants, et aucun test ne permet d'intégrer à moindre coût plusieurs des mécanismes à considérer pour le criblage.

L'analyse de la batterie de tests existants a révélé l'absence d'un test unique qui intégrerait les différents mécanismes de toxicité directe vis-à-vis de la glande thyroïde.

Aucun des modèles décrits n'est caractérisé pour sa capacité à cribler la toxicité thyroïdienne médiée par l'induction des UGT

1. La lignée cellulaire PCCL3, un modèle pertinent pour le criblage des différents mécanismes de toxicité directe vis-à-vis de la glande thyroïde

V. L'existant en termes de tests *in vitro* de criblage de la toxicité directe vis-à-vis de la thyroïde se limite à la prise en compte de deux cibles potentielles que sont la TPO et le NIS. Ces tests ont le grand avantage de pouvoir être adaptables au haut débit, moyennant somme toute des installations relativement lourdes et spécifiques (Katie B Paul et al., 2014b). L'intérêt de disposer d'un test à plus bas débit relève de la facilité à le mettre en place dans des installations standard de culture cellulaire et de biologie moléculaire, et intégrant plusieurs mécanismes décrits.

VI. Nous avons pu montrer au moyen d'une sélection de 7 gènes différents qu'il était envisageable de cribler divers mécanismes de toxicité lors d'un test unique basé sur l'utilisation de cultures de thyrocytes PCCL3 (Article 2, Fig.VI-4). Cette démonstration a malheureusement dû être faite au moyen d'un nombre limité de substances d'essai, mais il est intéressant de noter que les résultats ont été clairement différents entre les composés toxiques thyroïdiens et les composés connus pour ne pas affecter la thyroïde. Le fait qu'aucun résultat ne se soit avéré être ambigu est très encourageant. En testant un plus grand nombre de substances chimiques, il sera possible de mieux cerner les forces et faiblesses du modèle. Ainsi, comme cela avait été observé *in vivo*, il semble y avoir de fortes similitudes entre les profils de transcription des gènes exprimés dans les cellules traitées par le PTU et le MMI, tous deux toxiques *via* l'inhibition de la TPO. Il serait intéressant de vérifier que d'autres composés inhibiteurs de la TPO, comme l'amitrole, induisent le même type de profil d'expression des gènes sélectionnés. L'inhibition du transport intra-cellulaire de thyroglobuline et la libération des hormones par les thyrocytes est également un mécanisme décrit de perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes. C'est notamment le mode d'action toxique du lithium, dont l'effet sur les cellules PCCL3 n'a pu être testé. L'inhibition de la désiodation, qui a lieu dans la thyroïde dans le cadre de la synthèse

hormonale, par les déiodinases 1 et 2, peut également être inhibée par des composés comme l'acide iopanoïque ou le PTU (Renko et al., 2012; St Germain, 1988). De cette famille de composés toxiques, seul le PTU a été testé sur les cellules PCCl3, et son profil d'expression génique le rattache à son mode d'action principal, à savoir l'inhibition de la TPO. La capacité de détection de l'inhibition de la désiodation par les cellules PCCl3 reste donc à l'état d'hypothèse.

VII. Dans l'attente de résultats complémentaires, le choix de l'utilisation de la lignée cellulaire PCCl3, parmi les différentes lignées de cellules folliculaires thyroïdiennes décrites dans la littérature, pourra être davantage confirmé. En effet, différentes lignées ont été pressenties pour être utilisées pour le criblage. Le tableau VIII-1 présente brièvement les trois lignées dont les caractéristiques ont été jugées compatibles pour une utilisation en routine lors du criblage de la toxicité thyroïdienne directe, en suivant l'expression transcriptionnelle d'un certain nombre de gènes spécifiques. En comparaison avec les lignées humaines, la lignée PCCl3 présente l'avantage d'être une lignée de rat. Ceci serait un inconvénient si le but était de prédire directement la toxicité pour l'homme. Dans un contexte de criblage précoce qui précède des études *in vivo* sur rongeur, le fait de disposer d'une lignée de rat maximise les chances d'obtenir des résultats cohérents entre les deux types de tests. Cet avantage reste toutefois limité, compte tenu du fait que les trois modèles cellulaires sont des lignées caractérisées immortelles, avec des propriétés assez éloignées des cellules originales. Le principal atout des cellules PCCl3 par rapport aux autres lignées cellulaires est le fait de disposer d'une documentation assez bien fournie relative à leur usage en biologie moléculaire, en réponse à l'exposition à un excès d'iode. De plus, des gènes essentiels à la synthèse des hormones thyroïdiennes, codant pour la TPO et le NIS, ont été induits dans les PCCl3 suite à l'exposition à cet excès d'iode (Andrade et al., 2011; Leoni et al., 2008).

VIII. La lignée XTC-1, bien que moins étudiée, a été décrite comme exprimant les cinq gènes majeurs de la synthèse des hormones thyroïdiennes : La pendrine, le NIS, le récepteur à la TSH, la TPO, et la thyroglobuline (Meireles et al., 2007; Park et al., 2005). Malheureusement, après leur mise en culture dans notre laboratoire, aucune des

expressions basales essentielles pour la TPO, le NIS, et la Tg n'ont été retrouvées. La lignée FTC-133 a présenté le même type de problème. Même si l'expression des gènes codant pour le NIS, le récepteur à la TSH, et les déiodinases 1 et 2 avait été décrite au niveau de cette lignée dans de précédentes études (Feng et al., n.d.; Susarla et al., 1992), dans le cadre de ce présent travail seule l'expression du gène au récepteur à la TSH a été détectée . Il est ainsi toujours envisageable de travailler à nouveau avec ces cellules afin d'essayer de reproduire ces expressions basales, dans le but de pouvoir mesurer l'expression relative de ces gènes dans des cellules traitées par des substances d'essais. Il est à noter que la lignée FTC-133 présente l'avantage d'être disponible dans le commerce. Dans le cas des lignées PCCl3 et XTC-1, rien ne garantit l'absence d'évolution divergente entre les souches de différents laboratoires, d'autant plus que les conditions de culture ne sont pas partout identiques. Un autre intérêt de la disponibilité commerciale d'une lignée cellulaire est la garantie de bonne santé du lot. Les différentes cellules PCCl3 qui nous ont été envoyées dans un premier temps par différents laboratoires se sont toutes révélées positives à la contamination par les mycoplasmes, rendant impossible l'étude de la transcription des gènes.

Table VIII-1. Liste des modèles cellulaires envisagés pour le criblage de la toxicité directe sur la thyroïde

Lignée cellulaire	Disponibilité	Utilisation documentée	Forces	Faiblesses
PCCI3 (Rat)	Echange entre laboratoires	Mécanisme : régulation du NIS, excès d'iode	Induction des gènes de Tpo, NIS, Deiodinases, DUOX.	Sensibilité aux mycoplasmes.
XTC-1 (Humain)	Echange entre laboratoires	Carcinogenèse thyroïdienne	Expression basale documentée : Pendrine, NIS, TSHr, Tpo, Tg	Expression non reproduite. Capacité à l'induction inconnue
FTC-133 (Humain)	Disponible dans le commerce	Effet de l'excès d'iode sur l'expression des gènes	Expression documentée de NIS, TSHr, Tpo, Tg, DI, DII	Expression non reproduite.

2. Le modèle Liverbeads™ validé pour sa capacité à cribler les inducteurs des UGT toxiques thyroïdiens chez le rongeur

Partant du travail initié par Al Khansa et al. concernant la caractérisation des hépatocytes cryopréservés inclus dans des billes d'alginate, pour leur capacité à modéliser les inductions des différentes enzymes hépatiques, des investigations complémentaires ont été conduites pour évaluer le modèle Liverbeads™ pour sa capacité à cribler les substances inductrices des UGT hépatiques chez le rat.

Les inductions obtenues par Al Khansa et al. après exposition des hépatocytes au PCN et au PB ont été reproductibles, signe d'une bonne robustesse de ce modèle. En effet, les expérimentations ont été conduites à plusieurs années d'intervalle, par des opérateurs différents, avec des lots cellulaires différents sans que cela n'induisse la moindre variation dans les résultats. Six substances connues pour ne pas induire chez le rat de toxicité thyroïdienne secondaire médiée par l'induction des UGT hépatiques n'ont donné lieu à aucune induction de ces enzymes dans les Liverbeads. Comme tous les composés inducteurs

d'UGT hépatiques testés ont provoqué une induction de la transcription des gènes codant pour les UGT dans les Liverbeads, et comme aucune des substances non actives sur les UGT hépatiques testées n'a induit de telles augmentations de transcription, il est probable qu'un test basé sur l'étude de la transcription des gènes codant pour les UGT dans les Liverbeads fournisse de bonnes valeurs prédictives positives et négatives.

IX. En plus des résultats du travail réalisé par Al Khansa et al., les Liverbeads présentent certains avantages par rapport aux différents modèles d'hépatocytes disponibles, présentés dans le tableau VIII-2. Il existe globalement peu de travaux qui montrent la modélisation *in vitro* de l'induction des UGT hépatiques par les xénobiotiques. Sur cette base, peu de modèles parmi ceux présentés peuvent être écartés sur le critère que la reproduction des inductions qui se produisent *in vivo* est impossible. C'est notamment le cas de la lignée HepaRG de laquelle l'isoforme UGT 1A1, fortement impliquée dans la métabolisation des hormones thyroïdiennes, est absente. En l'absence d'information contradictoire, les cellules primaires –même cryopréservées- sont présumées plus proches des cellules physiologiques que les lignées dont les cellules, au moment de l'acquisition de l'immortalité, se sont forcément considérablement modifiées. Parmi les différentes façons de disposer d'hépatocytes primaires, la cryopréservation en est une, permettant de disposer d'autant de cellules que nécessaire, de faciliter la planification expérimentale, et surtout d'utiliser un lot unique sur une longue période. Leur inclusion dans des billes d'alginate apporte des facilités de manipulation et un bon rendement aux essais d'induction enzymatique.

Le modèle Liverbeads apparaît aujourd'hui suffisamment solide pour pouvoir être utilisé en routine pour le criblage de la toxicité thyroïdienne médiée par l'induction des UGT hépatiques. Des travaux sont en cours pour valider une utilisation optimisée des Liverbeads en couplant le criblage présenté ici avec celui des hépatotoxiques non carcinogènes, travail également initié par Al Khansa et al. (Al Khansa et al., 2010).

Table VIII-2. Liste des modèles cellulaires envisagés pour le criblage de l'induction des UGT hépatiques

Modèle	Disponibilité	Forces	Faiblesses	Références
Liverbeads (rat/souris, hépatocytes primaires)	Disponible dans le commerce	UGT du métabolisme des hormones thyroïdiennes inductibles	Coût élevé, Disponibilité à confirmer	{Al Khansa, 2010 #144}
Hépatocytes cryopréservés (rat/souris/ Humain)	Disponible dans le commerce	UGT inductibles	Peu de données sur les inductions d'UGT	(Uchaipichat et al., 2004)
Hepatocytes dérivés de cellules souche	Echange entre laboratoires	Quelques CYPs inductibles, expression d'UGT	Induction des UGT non documentée	{Sa- ngiamsuntorn, 2011 #153} {Ek, 2007 #154}
HepG2 (humain)	Disponible dans le commerce	Quelques CYPs inductibles	Peu de données sur les inductions d'UGT	(Ek et al., 2007)
Huh7 (humain)	Disponible dans le commerce	Quelques CYP et UGT inductibles	Peu de données sur les inductions d'UGT	{Barbier, 2003 #155}
HepaRG (Hepatome, humain)	Disponible dans le commerce	Expression basale des enzymes de métabolisation des médicaments proche des hépatocytes primaires	Pas d'expression de l'UGT 1A1	{Rogue, 2011 #150}
RALA255-10G LCS-3 (rat, Hepatome)	Echange entre laboratoires	UGT1A7 inductible	Peu de données sur les inductions d'autres UGT	{Grove, 1997 #152}
H4IIE (rat, Hepatome)	Disponible dans le commerce	Quelques CYP inductibles	The only UGT tested had a different profile from primary culture	{Fujimura, 2010 #151}
FL83B (rat, Hepatome)	Disponible dans le commerce	Pas d'information disponible sur les UGT	Pas d'information disponible sur les UGT	{Breslow, 1973 #171}
MCA RH7777 (rat, Hepatome)	Disponible dans le commerce	Quelques CYP inductibles	No information about UGTs	{Gujaeva, 1999 #172}

FAO (rat, Hépato)	Disponible dans le commerce	Quelques CYP inductibles par le Phénobarbital	Pas d'information disponible sur les UGT	{Shaw, 1993 #174}
Hepa 1c1c7 (souris, Hépato)	Disponible dans le commerce	UGT1A6 inductible via le récepteur AhR	Peu d'information disponible sur les UGT	{Korashy, 2012 #169}
Hepa 1-6 (souris, Hépato)	Disponible dans le commerce	Pas d'information disponible sur les UGT	Pas d'information disponible sur les UGT	Aucun article pertinent
AML12 (souris, dérivé d'une souche transgénique)	Disponible dans le commerce	Pas d'information disponible sur les UGT	Pas d'information disponible sur les UGT	{Wu, 1994 #170}
H2.35 (souris, transformée)	Disponible dans le commerce	Pas d'information disponible sur les UGT	Pas d'information disponible sur les UGT	{Westlind, 2001 #173}

3. Transport sanguin & déiodation

Comme discuté précédemment à l'occasion du criblage *in vivo*, la perturbation de l'axe HPT *via* une action sur les transporteurs sanguins ou sur la déiodation périphérique des hormones thyroïdiennes n'apparaît pas comme prioritaire au vu des incertitudes quant à l'existence d'effets délétère secondaires à de tels événements initiateurs (Zoeller et al., 2007). Il existe des tests spécifiques de criblage de la capacité à déplacer les hormones thyroïdiennes du transporteur sanguin TTR (OECD, 2014). Ces tests sont à un haut degré de mise au point, et immédiatement disponibles, et ne seront donc pas développés ici. Les tests *in vitro* d'évaluation de l'inhibition de l'activité déiodase sont décrits. Ils nécessitent le

prélèvement d'organes (foie) pour réaliser un broyat source de déiodinase. Le reste des consommables de ces tests sont disponibles dans le commerce. La mise en place des tests de deiodination est délicate et nécessite un travail de calibration et de mise au point important (OECD, 2014). Il a été suggéré que les substances qui interfèrent avec la liaison T₄-TTR pourraient également interférer avec la liaison T₄-déiodinases (Brouwer et al., 1998). La réalisation d'un seul des deux types de tests pourrait alors largement se justifier dans une optique de criblage précoce (Zoeller et al., 2007).

4. Batterie de tests *in vitro* proposée

L'utilisation du suivi de la transcription d'un certain nombre de gènes spécifiques sélectionnés, en tant que paramètre principal dans des tests réalisés *in vitro* sur culture cellulaire, a permis de proposer un test de criblage qui intègre les différents mécanismes de toxicité directe vis-à-vis de la thyroïde. Une approche comparable permet l'identification des toxiques thyroïdiens *via* l'induction des UGT hépatiques. Ces tests d'un nouveau genre permettent de réduire la batterie de tests à conduire, tout en élargissant le spectre de détection. Une batterie de tests est proposée tableau VIII-3. Elle intègre ces nouveaux tests, encore à développer pour ce qui est de la toxicité thyroïdienne directe, et des tests déjà disponibles et préconisés dans d'autres approches de criblage.

Tableau VIII-3. Proposition d'une batterie de tests à réaliser pour le criblage de la perturbation de l'axe HPT

Evènement initiateur de la toxicité pour l'axe HPT	Exemple de composé toxique	Test de criblage compétent
Interaction directe avec l'ADN (mutagène)	Nitrosamines	Tests de mutagénicité, non spécifique de la toxicité thyroïdienne (Cf. OCDE guidelines)
Augmentation du métabolisme hépatique et de l'élimination biliaire des hormones thyroïdiennes	Phénobarbital	Test Liverbeads, 48h, ciblé sur l'induction des UGT 1A1, 1A6, et 2B1
Inhibition de la capture d'iode	Perchlorate	Test PCCI3
Inhibition de la TPO	PTU, MMI, AMT	Test PCCI3
Excès d'iode	Nal, Amiodarone, IOF	Test PCCI3
Inhibition de la libération des hormones thyroïdiennes	Lithium	Test PCCI3 ?
Inhibition de la conversion de la T₄ en T₃ par les déiodinases	Acide iopanoïque, PTU	Test PCCI3? Test <i>in vitro</i> d'activité déiodinase
Inhibition du transport sanguin	PCBs	Test <i>in vitro</i> de compétition pour la fixation sur la transthyrétine

IX. Conclusion & perspectives

X. Un nouveau type de test de criblage a été envisagé et évalué dans le cadre de cette thèse. La mesure systématique de l'effet de l'exposition à des substances d'essais sur la transcription d'une sélection de gènes permet la détection de la mise en jeu d'évènements initiateurs de toxicité, sans avoir besoin de visualiser les conséquences délétères.

XI. Dans les études *in vivo* de 7 jours chez les rats, une sélection de transcrits de gènes impliqués dans la synthèse hormonale, couplée à ceux impliqués dans le cycle cellulaire ou la tumorigénèse, permet non seulement de détecter les perturbateurs de la synthèse hormonale au niveau de la thyroïde, mais également de donner des indications relatives aux mécanismes d'action impliqués. Cette approche novatrice semble donc permettre à la fois de répondre au besoin de disposer de tests précoces et de courte durée de criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne, et de fournir précocement des informations obtenues bien plus tard dans le cheminement des investigations. Les premiers indices relatifs au mode d'action toxique ne sont habituellement obtenus que lors de l'analyse comparée des résultats des différentes études *in vivo* présentées dans le cadre conceptuel de l'OCDE pour la détection des perturbateurs endocriniens.

XII. Une approche comparable a été imaginée pour le criblage *in vitro* de la toxicité directe sur la glande thyroïde. Le modèle cellulaire sélectionné, la lignée cellulaire PCCI3, est caractérisée par l'expression des gènes majeurs de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Ces cellules se sont montrées sensibles à quatre substances toxiques pour la thyroïde, et n'ont pas été affectées, du point de vue de la transcription des gènes sélectionnés comme « gènes sentinelles », par trois substances documentées pour ne pas affecter la thyroïde. L'identification de ce nouveau modèle, en parallèle avec le développement du modèle Liverbeads pour le criblage de la toxicité thyroïdienne médiée par le foie, a permis de proposer une nouvelle batterie de tests pertinents pour le criblage précoce de la perturbation de l'axe HPT.

XIII. Le travail présenté dans cette thèse est donc essentiellement une preuve du concept de criblage *via* des tests de durée trop courte pour laisser apparaître l'effet délétère, grâce à l'utilisation de la mesure de l'expression de gènes présélectionnés. Le modèle *in vivo* d'exposition orale de rats pendant 7 jours est d'ores et déjà utilisable en routine, ce qui est d'ailleurs indispensable pour constituer une base de données des profils de dérégulations de gènes et pour déterminer les valeurs prédictives positives et négatives du test imaginé. Le modèle *in vitro* est quant à lui tout juste identifié pour sa pertinence, et il sera nécessaire de le confronter à beaucoup plus de substances au profil toxicologique connu pour en déterminer la capacité à être utilisé dans un test de criblage de routine. Si tel est le cas, il est possible d'imaginer généraliser la batterie de tests présentée ici, ce qui représenterait une simplification importante et un élargissement du spectre de détection, au regard des procédures de criblage de la perturbation de l'axe HPT actuellement préconisées.

Références

- Abdelouahab, N., Suvorov, A., Pasquier, J.C., Langlois, M.F., Praud, J.P., Takser, L., 2009. Thyroid disruption by low-dose BDE-47 in prenatally exposed lambs. *Neonatology* 96, 120–124. doi:10.1159/000209316
- Al Khansa, I., Blanck, O., Guillouzo, A., Bars, R., 2010. Liverbeads: A practical and relevant in vitro model for gene induction investigations. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1598–1604. doi:10.1124/dmd.110.033753
- Al-Dujaili, E.A.S., Kenyon, C.J., Nicol, M.R., Mason, J.I., 2011. Liquorice and glycyrrhetic acid increase DHEA and deoxycorticosterone levels in vivo and in vitro by inhibiting adrenal SULT2A1 activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 102–9. doi:10.1016/j.mce.2010.12.011
- Andrade, B.M., Araujo, R.L., Perry, R.L., Souza, E.C., Cazarin, J.M., Carvalho, D.P., Ceddia, R.B., 2011. A novel role for AMP-kinase in the regulation of the Na⁺/I⁻-symporter and iodide uptake in the rat thyroid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1291–7. doi:ajpccell.00136.2010 [pii]10.1152/ajpccell.00136.2010
- Aqai, P., Frygan, C., Mizuguchi, M., Haasnoot, W., Nielen, M.W.F., 2012. Triple bioaffinity mass spectrometry concept for thyroid transporter ligands. *Anal. Chem.* 84, 6488–93. doi:10.1021/ac300543u
- Aquila, S., De Amicis, F., 2014. Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete functions. *Exp. Cell Res.* 328, 303–313. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.015
- Attanasio, R., Scinicariello, F., Blount, B.C., Valentin-Blasini, L., Rogers, K.A., Nguyen, D.C., Murray, H.E., 2011. Pendrin mediates uptake of perchlorate in a mammalian in vitro system. *Chemosphere* 84, 1484–1488. doi:S0045-6535(11)00429-2 [pii]10.1016/j.chemosphere.2011.04.038
- Bakker, O., van Beeren, H.C., Wiersinga, W.M., 1994. Desethylamiodarone is a noncompetitive inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone beta 1-receptor protein. *Endocrinology* 134, 1665–1670. doi:10.1210/endo.134.4.8137729
- Balta, a. Z., Filiz, a. I., Kurt, Y., Sucullu, I., Yucel, E., Akin, M.L., 2012. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med. Oncol.* 29, 734–741.

doi:10.1007/s12032-011-9969-x

- Becker, R.A., Bergfelt, Å.D.R., Borghoff, S., Davis, J.P., Hamby, B.T., Connor, J.C.O., Kaplan, A.M., Sloan, C.S., Tyl, R.W., Wade, M., Marty, M.S., 2012. Interlaboratory Study Comparison of the 15-Day Intact Adult Male Rat Screening Assay : Evaluation of an Antithyroid Chemical and a Negative Control Chemical. *Birth defects Res.* 95, 63–78. doi:10.1002/bdrb.20343
- Bellinger, D.C., 2013. Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update. *Saf. Health Work* 4, 1–11. doi:10.5491/SHAW.2013.4.1.1
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. WHO. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012, *Toxicology Letters*. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020
- Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ. Health Perspect.* 112, 9–17.
- Blystone, C.R., Lambright, C.S., Furr, J., Wilson, V.S., Gray, L.E., 2007. Iprodione delays male rat pubertal development , reduces serum testosterone levels , and decreases ex vivo testicular testosterone production & 174, 74–81. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.010
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur. J. Endocrinol.* 154, 599–611. doi:10.1530/eje.1.02128
- Bock, K.W., 2011. From differential induction of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver to characterization of responsible ligand-activated transcription factors, and their multilevel crosstalk in humans. *Biochem Pharmacol* 82, 9–16. doi:S0006-2952(11)00178-X [pii]10.1016/j.bcp.2011.03.011
- Braun, D., Lelios, I., Krause, G., Schweizer, U., 2013. Histidines in potential substrate recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8 (MCT8). *Endocrinology* 154, 2553–61. doi:10.1210/en.2012-2197
- Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Visser, T.J., 1998. Interactions of persistent environmental organohalogens with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Heal.* 14, 59–84.
- Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive

- androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor e. *Drug Metab Dispos* 37, 847–856. doi:dmd.108.024190 [pii]10.1124/dmd.108.024190 [doi]
- Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase mRNA Expression in Liver and Intestine by Activators of Aryl- Hydrocarbon Receptor , Constitutive Androstane Receptor , Pregnane X Receptor , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , and Nuclear Factor 37, 847–856. doi:10.1124/dmd.108.024190.regarded
- Butt, C.M., Wang, D., Stapleton, H.M., 2011. Halogenated phenolic contaminants inhibit the in vitro activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. *Toxicol. Sci.* 124, 339–47. doi:10.1093/toxsci/kfr117
- Calil-Silveira, J., Serrano-Nascimento, C., Nunes, M.T., 2012. Iodide treatment acutely increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid cell line by transcriptional mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 350, 118–124. doi:S0303-7207(11)00710-6 [pii] 10.1016/j.mce.2011.12.002
- Cao, J., Lin, Y., Guo, L.-H., Zhang, A.-Q., Wei, Y., Yang, Y., 2010. Structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with thyroxine transport proteins. *Toxicology* 277, 20–8. doi:10.1016/j.tox.2010.08.012
- Capen, C.C., 1994. Mechanisms of chemical injury of thyroid gland. *Prog. Clin. Biol. Res.* 387, 173–191.
- Capri, Y., Friesema, E.C.H., Kersseboom, S., Touraine, R., Monnier, A., Eymard-Pierre, E., Des Portes, V., De Michele, G., Brady, A.F., Boespflug-Tanguy, O., Visser, T.J., Vaurs-Barriere, C., 2013. Relevance of different cellular models in determining the effects of mutations on SLC16A2/MCT8 thyroid hormone transporter function and genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* 34, 1018–25. doi:10.1002/humu.22331
- Cariou, B., Zaïr, Y., Staels, B., Bruckert, E., 2011. Effects of the new dual PPAR α/δ agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 34, 2008–14. doi:10.2337/dc11-0093
- Carre, A., Rachdi, L., Tron, E., Richard, B., Castanet, M., Schlumberger, M., Bidart, J.M., Szinnai, G., Polak, M., 2011. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0016752

- Carreón-Rodríguez, A., Charli, J.-L., Pérez-Martínez, L., 2009. T3 differentially regulates TRH expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res.* 1305, 20–30. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.042
- Chang, H., Hu, J., Shao, B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3462–8.
- Chauhan, K.R., Kodavanti, P.R., McKinney, J.D., 2000. Assessing the role of ortho-substitution on polychlorinated biphenyl binding to transthyretin, a thyroxine transport protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 10–21. doi:10.1006/taap.1999.8826
- Chevalier, N., Fénichel, P., 2015. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes Metab.* 41, 107–115. doi:10.1016/j.diabet.2014.09.005
- Chlouchi, A., Girard, C., Bonet, A., Viollon-Abadie, C., Heyd, B., Manton, G., Martin, H., Richert, L., 2007. Effect of chrysin and natural coumarins on UGT1A1 and 1A6 activities in rat and human hepatocytes in primary culture. *Planta Med* 73, 742–747. doi:10.1055/s-2007-981548 [doi]
- Colborn, T., 2004. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ. Health Perspect.* 112, 944–949. doi:10.1289/ehp.6601
- Craft, E.S., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2002. Comparative responsiveness of hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in Long-Evans rats versus C57BL/6J mice exposed to TCDD-like and phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicol Sci* 68, 372–380.
- Crofton, K.M., Zoeller, R.T., 2005. Mode of action: neurotoxicity induced by thyroid hormone disruption during development--hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Crit Rev Toxicol* 35, 757–769.
- Cunha Lima, S.T., Nguyen, N.-H., Togashi, M., Apriletti, J.W., Nguyen, P., Polikarpov, I., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Webb, P., 2009. Differential effects of TR ligands on hormone dissociation rates: evidence for multiple ligand entry/exit pathways. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 117, 125–31. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.08.003
- De Gregorio, F., Pellegrino, M., Picchietti, S., Belardinelli, M.C., Taddei, A.R., Fausto, A.M., Rossi, M., Maggio, R., Giorgi, F., 2011. The insecticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) alters the membrane raft location of the TSH receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 121–9. doi:10.1016/j.taap.2011.03.018

- De Sandro, V., Catinot, R., Kriszt, W., Cordier, A., Richert, L., 1992. Male rat hepatic udp-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine. *Biochem. Pharmacol.* doi:10.1016/0006-2952(92)90215-5
- Delbès, G., Levacher, C., Habert, R., 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132, 527–38. doi:10.1530/rep.1.01231
- Dellarco, V.L., McGregor, D., Berry, S.C., Cohen, S.M., Boobis, A.R., 2006. Thiazopyr and thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance Framework for analysis of a cancer mode of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 793–801. doi:10.1080/10408440600975242
- Devonshire, A.S., Elaswarapu, R., Foy, C. a, 2011. Applicability of RNA standards for evaluating RT-qPCR assays and platforms. *BMC Genomics* 12, 118. doi:10.1186/1471-2164-12-118
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30, 293–342. doi:30/4/293 [pii]10.1210/er.2009-0002 [doi]
- Dronjak, S., Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Varagic, V., 2007. Effects of noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors on pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullar system of adult rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 614–20.
- Ek, M., Soderdahl, T., Kuppers-Munther, B., Edsbacke, J., Andersson, T.B., Bjorquist, P., Cotgreave, I., Jernstrom, B., Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., 2007. Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74, 496–503. doi:S0006-2952(07)00293-6 [pii]10.1016/j.bcp.2007.05.009
- Elaković, I., Vasiljević, D., Adzic, M., Djordjevic, A., Djordjevic, J., Radojčić, M., Matić, G., 2010. Sexually dimorphic functional alterations of rat hepatic glucocorticoid receptor in response to fluoxetine. *Eur. J. Pharmacol.* 632, 79–85. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.015
- Eng, P.H.K., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W., Braverman, L.E., 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140, 3404–3410. doi:10.1210/endo.140.8.6893
- EPA, n.d. Tier 1 Screening Battery | Endocrine Disruptor Screening Program | US EPA.

- European Commission, 2015. EC - Endocrine disruptors [WWW Document]. URL http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm (accessed 6.4.15).
- Feng, F., Wang, H., Fu, H., Wu, S., Ye, Z., Chen, S., Li, J., n.d. Dedifferentiation of differentiated thyroid carcinoma cell line FTC-133 is enhanced by ¹³¹I pretreatment. *Nucl Med Biol* 38, 1053–1058. doi:S0969-8051(11)00054-0 [pii]10.1016/j.nucmedbio.2011.03.001
- Fernández, L.P., López-Márquez, A., Santisteban, P., 2014. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 29–42. doi:10.1038/nrendo.2014.186
- Ferretti, E., Tosi, E., Po, a, Scipioni, a, Morisi, R., Espinola, M.S., Russo, D., Durante, C., Schlumberger, M., Screpanti, I., Filetti, S., Gulino, a, 2008. Notch signaling is involved in expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4080–7. doi:10.1210/jc.2008-0528
- Finch, J.M., Osimitz, T.G., Gabriel, K.L., Martin, T., Henderson, W.J., Capen, C.C., Butler, W.H., Lake, B.G., 2006. A mode of action for induction of thyroid gland tumors by Pyrethrins in the rat 214, 253–262. doi:10.1016/j.taap.2006.01.009
- Fini, J.-B., Riu, A., Debrauwer, L., Hillenweck, A., Le Mével, S., Chevolleau, S., Boulahtouf, A., Palmier, K., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Demeneix, B.A., Zalko, D., 2012. Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus* as a model for endocrine perturbation studies. *Toxicol. Sci.* 125, 359–67. doi:10.1093/toxsci/kfr312
- Flynn, T.R., Hollenberg, A.N., Cohen, O., Menke, J.B., Usala, S.J., Tollin, S., Hegarty, M.K., Wondisford, F.E., 1994. A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J. Biol. Chem.* 269, 32713–6.
- Fournel-Gigleux, S., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., Magdalou, J., 2010. The use of hepatocytes to investigate UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Methods Mol. Biol.* 640, 309–26. doi:10.1007/978-1-60761-688-7_17
- Freyberger, A., Ahr, H.-J., 2006. Studies on the goitrogenic mechanism of action of. *Stud. goitrogenic Mech. action N,N,N',N'-tetramethylthiourea* 217, 169–175. doi:10.1016/j.tox.2005.09.005
- Furuhashi, M., Suganuma, N., 2003. Effect of additional N-glycosylation signal in the N-terminal region on intracellular function of the human gonadotropin alpha-subunit.

Endocr. J. 50, 245–53.

- Fusco, a, Berlingieri, M.T., Di Fiore, P.P., Portella, G., Grieco, M., Vecchio, G., 1987. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3365–3370. doi:10.1128/MCB.7.9.3365.Updated
- Gelbke, H.P., Hofmann, A., Owens, J.W., Freyberger, A., 2007. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals: Comparison with toxicity tests of longer duration. *Arch. Toxicol.* 81, 227–250. doi:10.1007/s00204-006-0148-3
- Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., De Felice, M., Ambrosino, C., 2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 304, 21–31. doi:10.1016/j.tox.2012.12.001
- Gierach, I., Li, J., Wu, W.-Y., Grover, G.J., Wood, D.W., 2012. Bacterial biosensors for screening isoform-selective ligands for human thyroid receptors α -1 and β -1. *FEBS Open Bio* 2, 247–53. doi:10.1016/j.fob.2012.08.002
- Giuliani, C., Bucci, I., Di, S., Rossi, C., Grassadonia, A., Piantelli, M., Napolitano, G., 2014. The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. *FOOD Chem. Toxicol.* 66, 23–29. doi:10.1016/j.fct.2014.01.016
- Giuliani, C., Noguchi, Y., Harii, N., Napolitano, G., Tatone, D., Bucci, I., Piantelli, M., Monaco, F., Kohn, L.D., 2008. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* 149, 84–92. doi:10.1210/en.2007-0618
- Glatt, C.M., Ouyang, M., Welsh, W., Green, J.W., Connor, J.O., Frame, S.R., Everds, N.E., Poindexter, G., Snajdr, S., Delker, D. a., 2005. Molecular Characterization of Thyroid Toxicity: Anchoring Gene Expression Profiles to Biochemical and Pathologic End Points. *Environ. Health Perspect.* 113, 1354–1361. doi:10.1289/ehp.7690
- Golstein, J., Kimura, T., Miot, F., Dumont, J.E., 1999. Loss of several cell functions including okadaic acid-induced apoptosis after multiple passages in FRTL-5 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 150, 141–149. doi:10.1016/S0303-7207(99)00009-X
- Groef, B. De, Decallonne, B.R., Geyten, S. Van Der, Darras, V.M., Bouillon, R., 2006. Perchlorate versus other environmental sodium / iodide symporter inhibitors : potential thyroid-related health effects 17–25. doi:10.1530/eje.1.02190
- Grün, F., 2010. Obesogens. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 17, 453–459. doi:10.1097/MED.0b013e32833ddea0

- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M., Kanno, J., Iguchi, T., Blumberg, B., 2006. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol.* 20, 2141–55. doi:10.1210/me.2005-0367
- Hapgood, J.P., Koubovec, D., Louw, A., Africander, D., 2004. Not all progestins are the same: implications for usage. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 554–7. doi:10.1016/j.tips.2004.09.005
- Hard, G., 1998. Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 106, 427–436.
- Hashimoto, K., Zanger, K., Hollenberg, A.N., Cohen, L.E., Radovick, S., Wondisford, F.E., 2000. cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes. *J. Biol. Chem.* 275, 33365–72. doi:10.1074/jbc.M006819200
- Heaney, A.P., Nelson, V., Fernando, M., Horwitz, G., 2001. Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5025–5032. doi:10.1210/jc.86.10.5025
- Hood, A., Hashmi, R., Klaassen, C.D., Proliferation, C., Hood, H., Pharmacol, C.D.T.A., 1999. Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid-Follicular Cell Proliferation, Hyperplasia, and Hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 163–170.
- Hornung, M.W., Degitz, S.J., Korte, L.M., Olson, J.M., Kosian, P. a, Linnun, A.L., Tietge, J.E., 2010. Inhibition of thyroid hormone release from cultured amphibian thyroid glands by methimazole, 6-propylthiouracil, and perchlorate. *Toxicol. Sci.* 118, 42–51. doi:10.1093/toxsci/kfq166
- Hurley, P.M., Hill, R.N., Whiting, R.J., 1998. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents. *Environ. Health Perspect.* 106, 437. doi:10.2307/3434175
- INSERM, 2008. Cancer et Environnement. Expertise collective, INSERM.
- Jahnke, G.D., Choksi, N.Y., Moore, J. a., Shelby, M.D., 2004. Thyroid toxicants: Assessing reproductive health effects. *Environ. Health Perspect.* 112, 363–368. doi:10.1289/ehp.6637
- Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., Nishikawa, J., 2005. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol. Pharmacol.* 67, 766–74. doi:10.1124/mol.104.008409
- Kato, Y., Ikushiro, S., Emi, Y., Tamaki, S., Suzuki, H., Sakaki, T., Yamada, S., Degawa, M., 2008. Hepatic UDP-Glucuronosyltransferases Responsible for Glucuronidation of Thyroxine in Humans ABSTRACT : 36, 51–55. doi:10.1124/dmd.107.018184.glucuronidation
- Kennel, P.F., Pallen, C.T., Bars, R.G., 2004. Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disruptors (androgen and antiandrogens). *Reprod. Toxicol.* 18, 63–73. doi:10.1016/j.reprotox.2003.10.012
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001. Regulation of thyroid cell proliferation by tsh and other factors: A critical evaluation of in vitro models. *Endocr. Rev.* 22, 631–656. doi:10.1210/er.22.5.631
- King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D., Tephly, T.R., 2000. UDP-Glucuronosyltransferases 143–161.
- Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., 2005. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.* 76, 1589–601. doi:10.1016/j.lfs.2004.08.030
- Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2011. Toxicologic Pathology Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid Follicular Cell. doi:10.1080/019262301301418838
- Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2001. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular cell proliferation and thyroid hormone metabolism. *Toxicol Pathol* 29, 34–40.
- Klammer, H., Schlecht, C., Wuttke, W., Schmutzler, C., Gotthardt, I., Kohrle, J., Jarry, H., 2007. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology* 238, 192–199. doi:S0300-483X(07)00324-1 [pii]10.1016/j.tox.2007.06.088
- Klecha, A.J., Barreiro Arcos, M.L., Frick, L., Genaro, A.M., Cremaschi, G., 2008. Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation* 15, 68–75. doi:10.1159/000135626
- Kobayashi, K., Akune, H., Sumida, K., Saito, K., Yoshioka, T., Tsuji, R., 2009. Perinatal exposure to PTU decreases expression of Arc, Homer 1, Egr 1 and Kcna 1 in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1264, 24–32.

doi:10.1016/j.brainres.2008.12.029

- Kodavanti, P.R.S., Curras-Collazo, M.C., 2010. Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 479–96. doi:10.1016/j.yfrne.2010.06.005
- Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T., 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7329–7333.
- Kotake, Y., 2012. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1876–80.
- Larsen, D.A., Swanson, P., Dickey, J.T., Rivier, J., Dickhoff, W.W., 1998. In vitro thyrotropin-releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 276–85. doi:10.1006/gcen.1997.7031
- Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Cooper, R.L., 2003. Pubertal development in female Wistar rats following exposure to propazine and atrazine biotransformation by-products, diamino-S-chlorotriazine and hydroxyatrazine. *Toxicol Sci* 76, 190–200. doi:10.1093/toxsci/kfg223kfg223 [pii]
- Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J., Cooper, R.L., 2000. The Effects of Atrazine on Female Wistar Rats : An Evaluation of the Protocol for Assessing Pubertal Development and Thyroid Function. *Toxicol. Sci.* 376, 366–376.
- Lecat-guillet, N., Merer, G., Lopez, R., Pourcher, T., 2008. Small-Molecule Inhibitors of Sodium Iodide Symporter Function 06107, 889–895. doi:10.1002/cbic.200700682
- Leoni, S.G., Galante, P.A., Ricarte-Filho, J.C., Kimura, E.T., 2008. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics* 91, 356–366. doi:S0888-7543(08)00017-7 [pii]10.1016/j.ygeno.2007.12.009
- Leoni, S.G., Kimura, E.T., Santisteban, P., De la Vieja, A., 2011. Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. *Mol Endocrinol* 25, 1924–1935. doi:me.2011-0038 [pii]10.1210/me.2011-0038
- Lévy-Bimbot, M., Major, G., Courilleau, D., Blondeau, J.-P., Lévi, Y., 2012. Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: use of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding. *Chemosphere* 87, 782–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.080

- Lezoualc'h, F., Hassan, A.H., Giraud, P., Loeffler, J.P., Lee, S.L., Demeneix, B.A., 1992. Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol. Endocrinol.* 6, 1797–804. doi:10.1210/mend.6.11.1480171
- Lowry, C.A., Hale, M.W., Plant, A., Windle, R.J., Shanks, N., Wood, S.A., Ingram, C.D., Renner, K.J., Lightman, S.L., Summers, C.H., 2009. Fluoxetine inhibits corticotropin-releasing factor (CRF)-induced behavioural responses in rats. *Stress* 12, 225–39. doi:10.1080/10253890802309861
- Lv, M., Zhang, X., Li, M., Chen, Q., Ye, M., Liang, W., Ding, L., Cai, H., Fu, D., Lv, Z., 2013. miR-26a and its Target CKS2 Modulate Cell Growth and Tumorigenesis of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0067591
- Ma, X., Lian, Q.-Q., Dong, Q., Ge, R.-S., 2011. Environmental inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Toxicology* 285, 83–9. doi:10.1016/j.tox.2011.04.007
- Mackenzie, P.I., Bock, K.W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O., Owens, I.S., Nebert, D.W., 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15, 677–685. doi:01213011-200510000-00001 [pii]
- Marchesini, G.R., Meulenberg, E., Haasnoot, W., Mizuguchi, M., Irth, H., 2006. Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. *Anal. Chem.* 78, 1107–14. doi:10.1021/ac051399i
- Martin, M.T., Brennan, R.J., Hu, W., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H., Wood, C.R., Corton, J.C., Kavlock, R.J., Dix, D.J., 2007. Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* 97, 595–613. doi:10.1093/toxsci/kfm065
- Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M., 2009. The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages. *Toxicol. Sci.* 109, 50–8. doi:10.1093/toxsci/kfp044
- Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmacokinetics and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and identification of knowledge gaps. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 696–724. doi:10.3109/10408444.2014.930813
- McClain, R.M., 1995. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutat. Res.* 333, 131–142. doi:10.1016/0027-

- McClain, R.M., Levin, A.A., Posch, R., Downing, J.C., 1989. The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 99, 216–228. doi:0041-008X(89)90004-5 [pii]
- McClain, R.M., Posch, R.C., Bosakowski, T., Armstrong, J.M., 1988. Studies on the mode of action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* 94, 254–265.
- Mcdougal, J.N., Jones, K.L., Fatuyi, B., Gray, K.J., Blount, B.C., Valentín-blasini, L., Fisher, J.W., 2011. Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues The Effects of Perchlorate on Thyroidal Gene Expression are Different from the Effects of Iodide Deficiency 37–41. doi:10.1080/15287394.2011.573740
- McLean, A.E., Driver, H.E., Sutherland, I.A., 1992. Liver tumour promotion by phenobarbital: comparison of rat and human studies. *Prog Clin Biol Res* 374, 251–259.
- Meek, M.E.B., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKeeman, L.D., Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D.E., 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 591–653. doi:10.1080/713608373
- Meireles, A.M., Preto, A., Rocha, A.S., Rebocho, A.P., Maximo, V., Pereira-Castro, I., Moreira, S., Feijao, T., Botelho, T., Marques, R., Trovisco, V., Cirnes, L., Alves, C., Velho, S., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M., 2007. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid* 17, 707–715. doi:10.1089/thy.2007.0097
- Merrill, E.A., Clewell, R.A., Gearhart, J.M., Robinson, P.J., Sterner, T.R., Yu, K.O., Mattie, D.R., Fisher, J.W., 2003. PBPK Predictions of Perchlorate Distribution and Its Effect on Thyroid Uptake of Radioiodide in the Male Rat. *Toxicol. Sci.* 73, 256–269. doi:10.1093/toxsci/kfg080
- Mijiddorj, T., Kanasaki, H., Purwana, I.N., Oride, A., Miyazaki, K., 2011. Stimulatory effect of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 172–9. doi:10.1016/j.mce.2011.04.010
- Miller, M.D., Crofton, K.M., Rice, D.C., Zoeller, R.T., 2009. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Env. Heal. Perspect* 117, 1033–1041. doi:10.1289/ehp.0800247 [doi]

- Miot, F., Dupuy, C., Dumont, J., Rousset, B., 2000. Thyroid Hormone Synthesis and Secretion, in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O. (Eds.), . South Dartmouth (MA).
- Monte, M., Benetti, R., Buscemi, G., Sandy, P., Del Sal, G., Schneider, C., 2003. The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 30356–30364. doi:10.1074/jbc.M302902200
- Moon, M.K., Jeong, I.-K., Oh, T.J., Ahn, H.Y., Kim, H.H., Park, Y.J., Jang, H.C., Park, K.S., 2015. Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance. *J. Endocrinol.* doi:10.1530/JOE-14-0714
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., Brent, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94, 355–82. doi:10.1152/physrev.00030.2013
- Murk, A.J., Rijntjes, E., Blaauboer, B.J., Clewell, R., Crofton, K.M., Dingemans, M.M.L., Furlow, J.D., Kavlock, R., Köhrle, J., Opitz, R., Traas, T., Visser, T.J., Xia, M., Gutleb, A.C., 2013. Toxicology in Vitro Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicol. Vitro.* 27, 1320–1346. doi:10.1016/j.tiv.2013.02.012
- Newbold, R.R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199, 142–50. doi:10.1016/j.taap.2003.11.033
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N., 2009. Environmental estrogens and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–9. doi:10.1016/j.mce.2009.02.024
- Nishimura, N., Nishimura, H., Ito, T., Miyata, C., Izumi, K., Fujimaki, H., Matsumura, F., 2009. Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 301–9.
- Noda, S., Muroi, T., Takakura, S., Sakamoto, S., Takatsuki, M., Yamasaki, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., 2005. Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid function modulators. *Arch. Toxicol.* 79, 627–635. doi:10.1007/s00204-005-0677-1
- O Connor, J.C., Frame, S.R., Ladics, G.S., 2002. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol. Sci.* 69, 79–91. doi:10.1093/toxsci/69.1.79
- OECD, 2014. New Scoping Document on in vitro and ex vivo Assays for the Identification of

Modulators of Thyroid Hormone Signalling.

- OECD, 2012a. Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel in vitro and in vivo Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors.
- OECD, 2012b. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption.
- OECD, 2006a. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays, Series on Testing and Assessment. OECD.
- OECD, 2006b. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assay.
- Ohba, K., Sasaki, S., Matsushita, A., Iwaki, H., Matsunaga, H., Suzuki, S., Ishizuka, K., Misawa, H., Oki, Y., Nakamura, H., 2011. GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. *PLoS One* 6, e18667. doi:10.1371/journal.pone.0018667
- Olsen, J.H., Wallin, H., Boice Jr., J.D., Rask, K., Schulgen, G., Fraumeni Jr., J.F., 1993. Phenobarbital, drug metabolism, and human cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2, 449–452.
- Ortega, E., Osorio, A., Ruiz, E., 1996. Inhibition of 5'DI and 5'DII L-tiroxine (T4) monodeiodinases. Effect on the hypothalamo-pituitary ovarian axis in adult hypothyroid rats treated with T4. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 853–860.
- Papineni, S., Marty, M.S., Rasoulpour, R.J., LeBaron, M.J., Pottenger, L.H., Eisenbrandt, D.L., 2015. Mode of action and human relevance of pronamide-induced rat thyroid tumors. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 541–551. doi:10.1016/j.yrtph.2015.02.012
- Park, J.W., Zarnegar, R., Kanauchi, H., Wong, M.G., Hyun, W.C., Ginzinger, D.G., Lobo, M., Cotter, P., Duh, Q.Y., Clark, O.H., 2005. Troglitazone, the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 15, 222–231. doi:10.1089/thy.2005.15.222
- Patrick, L., 2009. Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. *Altern Med Rev* 14, 326–346.
- Paul, K.B., Hedge, J.M., Macherla, C., Filer, D.L., Burgess, E., Simmons, S.O., Crofton, K.M., Hornung, M.W., 2013. Cross-species analysis of thyroperoxidase inhibition by xenobiotics demonstrates conservation of response between pig and rat. *Toxicology* 312, 97–107. doi:10.1016/j.tox.2013.08.006
- Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Crofton, K.M., Hornung, M.W., Simmons, S.O., 2014a.

- Development of Medium-Throughput Thyroperoxidase (TPO) Inhibition Assays for Screening, in: Innovative Research for a Sustainable Future. p. 4.
- Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014. Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–399. doi:10.1021/tx400310w
- Paul, K.B., Hedge, J.M., Rotroff, D.M., Hornung, M.W., Crofton, K.M., Simmons, S.O., 2014b. Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 387–99. doi:10.1021/tx400310w
- Pesce, L., Bizhanova, A., Caraballo, J.C., Westphal, W., Butti, M.L., Comellas, A., Kopp, P., 2012. TSH regulates pendrin membrane abundance and enhances iodide efflux in thyroid cells. *Endocrinology* 153, 512–521. doi:en.2011-1548 [pii] 10.1210/en.2011-1548
- Pickford, D.B., 2010. Screening chemicals for thyroid-disrupting activity: A critical comparison of mammalian and amphibian models. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 845–92. doi:10.3109/10408444.2010.494250
- Pitsiavas, V., Smerdely, P., Boyages, S.C., 1999. Amiodarone compared with iodine exhibits a potent and persistent inhibitory effect on TSH-stimulated cAMP production in vitro : a possible mechanism to explain amiodarone-induced hypothyroidism 241–249.
- Qatanani, M., Zhang, J., Moore, D.D., 2005. Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995–1002. doi:en.2004-1350 [pii]10.1210/en.2004-1350
- Radvila, A., Roost, R., Burgi, H., Kohler, H., Studer, H., 1976. Inhibition of thyroglobulin biosynthesis and degradation by excess iodide. Synergism with lithium. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 81, 495–506.
- Rajkovic, V., Matavulj, M., Johansson, O., 2010. Studies on the synergistic effects of extremely low-frequency magnetic fields and the endocrine-disrupting compound atrazine on the thyroid gland. *Int J Radiat Biol* 86, 1050–1060. doi:10.3109/09553002.2010.501837
- Raldúa, D., Babin, P.J., 2009. Simple, Rapid Zebrafish Larva Bioassay for Assessing the Potential of Chemical Pollutants and Drugs to Disrupt Thyroid Gland Function. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6844–6850. doi:10.1021/es9012454
- Raldúa, D., Thienpont, B., Babin, P.J., 2012. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative

- system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reprod. Toxicol.* 33, 188–197. doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.001
- Rao, M.S., Reddy, J.K., 1987. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 8, 631–6.
- Renko, K., Hoefig, C.S., Hiller, F., Schomburg, L., Köhrle, J., 2012. Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay. *Endocrinology* 153, 2506–13. doi:10.1210/en.2011-1863
- Ri, F., Kerchner, G., Persing, R., RI, B., 1978. Dietary subacute toxicity of ethylene thiourea in the laboratory rat . PubMed Commons 2014.
- Richardson, V.M., Staskal, D.F., Ross, D.G., Diliberto, J.J., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S., 2008. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 244–50. doi:10.1016/j.taap.2007.09.015
- Ronco, A.M., Urrutia, M., Montenegro, M., Llanos, M.N., 2009. Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. *Toxicol. Lett.* 188, 186–91. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.008
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–7.
- Rouquié, D., Tinwell, H., Blanck, O., Schorsch, F., Geter, D., Wason, S., Bars, R., 2014. Thyroid tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of hepatic CAR / PXR nuclear receptors. doi:10.1016/j.yrtph.2014.10.003
- Ruiz-Llorente, S., de Pau, E.C., Sastre-Perona, A., Montero-Conde, C., Gómez-López, G., Fagin, J. a, Valencia, A., Pisano, D.G., Santisteban, P., 2012. Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* 13, 147. doi:10.1186/1471-2164-13-147
- Santini, F., Vitti, P., Ceccarini, G., Mammoli, C., Rosellini, V., Pelosini, C., Marsili, A., Tonacchera, M., Agretti, P., Santoni, T., Chiovato, L., Pinchera, A., 2003. In vitro assay of thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol Invest* 26, 950–955. doi:5514 [pii]
- Schmutzler, C., Bacinski, A., Gotthardt, I., Huhne, K., Ambrugger, P., Klammer, H., Schlecht, C., Hoang-Vu, C., Gruters, A., Wuttke, W., Jarry, H., Köhrle, J., 2007. The ultraviolet filter

- benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148, 2835–2844. doi:en.2006-1280 [pii]10.1210/en.2006-1280
- Schmutzler, C., Gotthardt, I., Hofmann, P.J., Radovic, B., Kovacs, G., Stemmler, L., Nobis, I., Bacinski, A., Mentrup, B., Ambrugger, P., Grüters, A., Malendowicz, L.K., Christoffel, J., Jarry, H., Seidlovà-wuttke, D., Wuttke, W., Köhrle, J., 2007. Monograph Endocrine Disruptors and the Thyroid Gland — A Combined in Vitro and in Vivo Analysis of Potential New Biomarkers 115, 77–83. doi:10.1289/ehp.9369
- Schuur, A.G., van Leeuwen-Bol, I., Jong, W.M., Bergman, A., Coughtrie, M.W., Brouwer, A., Visser, T.J., 1998. In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics. *Toxicol. Sci.* 45, 188–94. doi:10.1006/toxs.1998.2504
- Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., Braun, D., 2014. Structure and function of thyroid hormone plasma membrane transporters. *Eur. Thyroid J.* 3, 143–53. doi:10.1159/000367858
- Serrano-Nascimento, C., Calil-Silveira, J., Goulart-Silva, F., Nunes, M.T., 2012. New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCCl₃ cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 154–161. doi:10.1016/j.mce.2011.09.036
- Shankar, K., Liu, X., Singhal, R., Chen, J.-R., Nagarajan, S., Badger, T.M., Ronis, M.J.J., 2008. Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology* 149, 1748–56. doi:10.1210/en.2007-0903
- Shelby, M.K., Klaassen, C.D., 2006. Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1772–1778. doi:10.1124/dmd.106.010397
- Shen, O., Du, G., Sun, H., Wu, W., Jiang, Y., Song, L., Wang, X., 2009. Comparison of in vitro hormone activities of selected phthalates using reporter gene assays. *Toxicol. Lett.* 191, 9–14. doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.019
- Singh, B., Dhawan, D., Chand, B., 1994. Biokinetics of Iodine- 131 in Rat Thyroid Following Lead and Lithium Supplementation 287–293.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum.*

Reprod. 16, 972–8.

- Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A., Cederroth, C.R., Combescure, C., Nef, S., Aubert, M.L., Hüppi, P.S., 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ. Health Perspect.* 117, 1549–55. doi:10.1289/ehp.11342
- Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Fisher, J.S., Leffers, H., Rajpert-de Meyts, E., Skakkebaek, N.E., 2004. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ testis and the testicular dysgenesis syndrome? *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 88, 144–51.
- St Germain, D.L., 1988. Dual mechanisms of regulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase in the rat kidney, liver, and thyroid gland. Implications for the treatment of hyperthyroidism with radiographic contrast agents. *J. Clin. Invest.* 81, 1476–1484.
- St Germain, D.L., Galton, V.A., Hernandez, A., 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150, 1097–1107. doi:10.1210/en.2008-1588
- Stoker, T.E., Ferrell, J.M., Laws, S.C., Cooper, R.L., Buckalew, a., 2006. Evaluation of ammonium perchlorate in the endocrine disruptor screening and testing program's male pubertal protocol: Ability to detect effects on thyroid endpoints. *Toxicology* 228, 58–65. doi:10.1016/j.tox.2006.08.026
- Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L., 2002. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 67, 198–206.
- Stump, D.G., O'Connor, J.C., Lewis, J.M., Marty, M.S., 2014. Key Lessons from Performance of the U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 Male and Female Pubertal Assays. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 101, 43–62. doi:10.1002/bdrb.21097
- Sun, H., Shen, O.-X., Xu, X.-L., Song, L., Wang, X.-R., 2008. Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology* 249, 238–42. doi:10.1016/j.tox.2008.05.008
- Susarla, R., Gonzalez, A.M., Watkinson, J.C., Eggo, M.C., 1992. Expression of receptors for VEGFs on normal human thyroid follicular cells and their role in follicle formation. *J Cell Physiol* 227, 1992–2002. doi:10.1002/jcp.22930
- Suvorov, A., Girard, S., Lachapelle, S., Abdelouahab, N., Sebire, G., Takser, L., 2009. Perinatal exposure to low-dose BDE-47, an emergent environmental contaminant, causes hyperactivity in rat offspring. *Neonatology* 95, 203–209. doi:10.1159/000155651

- Suzuki, K., Lavaroni, S., Mori, a, Ohta, M., Saito, J., Pietrarelli, M., Singer, D.S., Kimura, S., Katoh, R., Kawaoi, a, Kohn, L.D., 1998. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8251–8256. doi:10.1073/pnas.95.14.8251
- Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M., 2006. Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with beta-estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci* 97, 25–31. doi:CAS [pii]10.1111/j.1349-7006.2005.00132.x
- Temple, R., Berman, M., Robbins, J., Wolff, J., 1972. The Use of Lithium the Treatment of Thyrotoxicosis 274.
- Tong, Z., Li, H., Goljer, I., McConnell, O., Chandrasekaran, A., 2007. In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* 35, 2203–2210. doi:10.1124/dmd.107.016972
- Trachtenberg, J., Zadra, J., 1988. Steroid synthesis inhibition by ketoconazole: sites of action. *Clin. Invest. Med.* 11, 1–5.
- Tsujio, M., Watahiki, Y., Yoshioka, K., Mutoh, K., 2007. Morphology of thyroid follicular cells of methimazole-treated rats. *Anat Histol Embryol* 36, 290–294. doi:AHE764 [pii]10.1111/j.1439-0264.2007.00764.x
- Uchaipichat, V., Mackenzie, P.I., Guo, X.H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J.B., Miners, J.O., 2004. Human UDP-glucuronosyltransferases: Isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab. Dispos.* 32, 413–423. doi:10.1124/dmd.32.4.413
- Uyttersprot, N., Costagliola, S., Dumont, J.E., Miot, F., 1999. Requirement for cAMP-response element (CRE) binding protein/CRE modulator transcription factors in thyrotropin-induced proliferation of dog thyroid cells in primary culture. *Eur. J. Biochem.* 259, 370–8.
- Uzumcu, M., Kuhn, P.E., Marano, J.E., Armenti, A.E., Passantino, L., 2006. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 191, 549–58. doi:10.1677/joe.1.06592
- van Beeren, H.C., Bakker, O., Wiersinga, W.M., 1995. Desethylamiodarone is a competitive

- inhibitor of the binding of thyroid hormone to the thyroid hormone α -receptor protein. *Mol Cell Endocrinol* 112, 15 – 19.
- van Beeren, H.C., Kwakkel, J., Ackermans, M.T., Wiersinga, W.M., Fliers, E., Boelen, A., 2012. Action of specific thyroid hormone receptor α (1) and β (1) antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat. *Thyroid* 22, 1275–82. doi:10.1089/thy.2012.0135
- Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5814–20.
- Vansell, N.R., 2002. Effect of Microsomal Enzyme Inducers on the Biliary Excretion of Triiodothyronine (T₃) and Its Metabolites. *Toxicol. Sci.* 65, 184–191. doi:10.1093/toxsci/65.2.184
- Vansell, N.R., Klaassen, C.D., 2002. Increase in rat liver udp-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 30, 240–246. doi:10.1124/dmd.30.3.240
- Visser, T.J., 2000. Cellular Uptake of Thyroid Hormones, in: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., Weickert, M.O. (Eds.), . South Dartmouth (MA).
- Walters, K.A., Simanainen, U., Handelsman, D.J., 2010. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum. Reprod. Update* 16, 543–58. doi:10.1093/humupd/dmq003
- Waltz, F., Pillette, L., Ambroise, Y., 2010. A nonradioactive iodide uptake assay for sodium iodide symporter function. *Anal. Biochem.* 396, 91–5. doi:10.1016/j.ab.2009.08.038
- Wang, F., Zhang, Q., Zhang, X., Luo, S., Ye, D., Guo, Y., Chen, S., Huang, Y., 2014. Preeclampsia induced by cadmium in rats is related to abnormal local glucocorticoid synthesis in placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 77. doi:10.1186/1477-7827-12-77
- Wang, Y.-X., Lee, C.-H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., Evans, R.M., 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159–70.
- Watkins, J.B., Klaassen, C.D., 1982. Induction of UDP-glucuronosyltransferase activities in Gunn, heterozygous, and Wistar rat livers by pregnenolone-16 α -carbonitrile. *Drug*

Metab Dispos 10, 590–594.

- Webb, P., Nguyen, N.-H., Chiellini, G., Yoshihara, H.A.I., Cunha Lima, S.T., Apriletti, J.W., Ribeiro, R.C.J., Marimuthu, A., West, B.L., Goede, P., Mellstrom, K., Nilsson, S., Kushner, P.J., Fletterick, R.J., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., 2002. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 59–73.
- Weiss, J.M., Andersson, P.L., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., van Leeuwen, S.P.J., Hamers, T., 2009. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol. Sci.* 109, 206–16. doi:10.1093/toxsci/kfp055
- Westholm, D.E., Stenehjem, D.D., Rumbley, J.N., Drewes, L.R., Anderson, G.W., 2009. Competitive inhibition of organic anion transporting polypeptide 1c1-mediated thyroxine transport by the fenamate class of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Endocrinology* 150, 1025–32. doi:10.1210/en.2008-0188
- Wilson, M.R., 2009. *The Endocrine System: Hormones, Growth, and Development*. The Rosen Publishing Group.
- Wolff, J., 1998. Perchlorate and the Thyroid Gland. *Pharmacol. Rev.* 50, 89–105.
- Wolff, J., Chaikoff, I.L., 1948. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J. Biol. Chem.* 174, 555–564.
- Wu, B., Li, S., Dong, D., 2013. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic receptors CAR, PXR and VDR. *Drug Discov. Today* 18, 574–81. doi:10.1016/j.drudis.2013.01.001
- Wu, F., Zhou, X., Zhang, R., Pan, M., Peng, K.L., 2012. The effects of ammonium perchlorate on thyroid homeostasis and thyroid-specific gene expression in rat. *Environ. Toxicol.* 27, 445–452. doi:10.1002/tox.20655
- You, S.H., Gauger, K.J., Bansal, R., Zoeller, R.T., 2006. 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257-258, 26–34. doi:S0303-7207(06)00325-X [pii]10.1016/j.mce.2006.06.009 [doi]
- Yu, K.O., Narayanan, L., Mattie, D.R., Godfrey, R.J., Todd, P.N., Sterner, T.R., Mahle, D.A., Lumpkin, M.H., Fisher, J.W., 2002. The pharmacokinetics of perchlorate and its effect on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 182, 148–159. doi:S0041008X02994329 [pii]
- Zhang, H.F., Lin, X.H., Yang, H., Zhou, L.C., Guo, Y.L., Barnett, J. V, Guo, Z.M., 2012. Regulation

- of the activity and expression of aryl hydrocarbon receptor by ethanol in mouse hepatic stellate cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 1873–81. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01787.x
- Zhang, N., Chu, E.S.H., Zhang, J., Li, X., Liang, Q., Chen, J., Chen, M., Teoh, N., Farrell, G., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2014. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits hepatocarcinogenesis through mediating NF- κ B signaling pathway. *Oncotarget* 5, 8330–40.
- Zhou, T., Ross, D.G., Devito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol. Sci.* 61, 76–82. doi:10.1093/toxsci/61.1.76
- Zhou, X., 2010. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *J. Androl.* 31, 235–43. doi:10.2164/jandrol.109.009266
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612. doi:en.2004-1018 [pii]10.1210/en.2004-1018 [doi]
- Zoeller, R.T., Tan, S.W., 2007. Implications of research on assays to characterize thyroid toxicants. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 195–210. doi:10.1080/10408440601123578
- Zoeller, R.T., Tyl, R.W., Tan, S.W., 2007. Current and potential rodent screens and tests for thyroid toxicants. *Crit Rev Toxicol* 37, 55–95. doi:770421600 [pii]10.1080/10408440601123461 [doi]
- Zoeller, T.R., 2010. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm.* 9, 28–40.
- Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E., 2009. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol Sci* 107, 56–64. doi:kfn225 [pii]10.1093/toxsci/kfn225

Annexe : Revue de littérature concernant les tests in vitro et in vitro rapides existants

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vitro</i>	DNA binding assay	Toutes les espèces	Liaison TR-ADN ([TH response element [TRE]])	Effet de la T ₃	Adaptation au haut-débit; détection des mécanismes toxiques de type PBDE	Détection d'un unique mécanisme (liaison TR-ADN)	(OECD, 2012)
<i>In vitro</i>	In vitro receptor binding	Récepteurs recombinants isolés de toutes espèces de vertébrés	Liaison de la T ₃ à son récepteur	Mécanisme impliqué dans la perturbation de la transmission du signal	faible taux de faux positifs; Adaptation au haut-débit	Fort taux de faux négatifs, pas d'activation métabolique, solubilité en milieu aqueux indispensable	Extracts from: (OECD, 2006)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vitro</i>	Test d'activation d'un récepteur (Recombinant : quelle que soit l'espèce)	Différentes lignées cellulaires	Test fonctionnel : recherche sur la pharmacologie et le mode d'action d'une substance	Effet de la T ₄ sur les tissus et organes	Identification des effets agonistes ou antagonistes; Applicable à de nombreuses lignées	Activité métabolique limitée; Paroi cellulaire, lorsque réalisé sur levure	Traduit de : (OECD, 2006)
<i>In vitro</i>	Thyroid Peroxidase (TPO) utilisant la lactopéroxidase	?????	Organification des ions iodeure	Organification des ions iodeure	Sensible ; Faux-positifs peu probables ; Tests <i>In vitro</i> ; Adaptable à des utilisations haut-débit	TPO humaine ou murine indisponible; Fort taux de faux négatifs dû à la spécificité; Ciblage d'un unique mode d'action responsable des variations des taux d'hormones	Traduit de - : (OECD, 2006)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vitro</i>	Fixation aux protéines plasmatiques (TBG, TTR)	Rat, humain, Adaptable à d'autres espèces	Déplacement de T ₄ de ses protéines de transport; Réduction de la concentration plasmatique de T ₄ .	Potentiellement un des mécanismes par lesquels des substances induisent une diminution de la concentration plasmatique de T ₄ ; Pourrait réduire l'incorporation de T ₄ par les tissus, cerveau compris.	Niveau de mise au point ; Adaptable pour le haut-débit; prédictif pour les produits affectant la T ₄ fœtale.	De nombreux autres modes d'action affectent les concentrations plasmatiques d'hormones ; les expériences avec des animaux ko pour le TTR ne confirment pas l'hypothèse de l'implication de ce mécanisme d'action dans l'apparition des effets adverses	Traduit de : (OECD, 2006)
<i>In vitro</i>	Deiodinases	Amphibiens, poissons, mammifères	Conversion de la T ₄ en T ₃ (outer ring deiodinase) ou inversement (inner ring deiodinase)	Potentiellement un mécanisme par lequel les tissus régulent leur sensibilité aux THs	Niveau de mise au point ; Mécanisme important	Essai unique impossible (trois types de déiodinases à tester) ; déiodinases différentes selon les tissus et les organes	(Butt et al., 2011; Cornelia Schmutzler et al., 2007)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaire
<i>In vitro</i>	Glucuronidation	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>), autres espèces possibles	T ₄ glucuronylée	Désactivation de la T ₄ , réduction des niveaux circulants de THs	Niveau de mise au point; Essais <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> possibles ; peu sensible aux rythmes nycthéméraux et au stress	Spécifique à un unique MOA; Nombreux faux-négatifs; Durée longue de l'essai	Traduit de : (OECD, 2006)
<i>In vitro</i>	T-screen, GH ₃ cell assay	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Croissance/prolifération; Signaux cellulaires; Mise en place possible pour la détection des agonistes/antagonistes	Effet tissulaire de T ₃	Adaptable au haut débit; Utilisation d'un faible nombre d'animaux ; Détection d'une activité agoniste et antagoniste	Spécifique de la liaison au TR	Traduit de : (OECD, 2006)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaire
<i>In vitro</i>	Thyroid Peroxydase Inhibition Assay	Humain	Activité enzymatique de TPO exprimée en μ mole de H_2O_2 disparue par minute	Organification des ions Iodure	Mécanisme important, lignée cellulaire humaine	TPO humaine ou rongeur indisponible; Fort taux de faux-négatifs dû à la spécificité pour un unique MOA	(OECD, 2012)
<i>In vitro</i>	FRTL-5	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Capture de l'iode; autres fonctions thyroïdiennes (e.g., synthèse de Tg, production d'AMPc en réponse au TSH)	Activité NIS	Cellules thyroïdiennes	De nombreux autres MOAs affectent les concentrations plasmatiques de THs	(OECD, 2006)Rat: la perturbation de la transduction du signal du TSHR ne serait pas pertinent (OECD, 2011; Song et al.)
<i>In vitro</i>	Transient transfection with TR α and TR β	Différents types de lignées cellulaires de mammifères	Evaluation de la capacité de liaison au TR	Activité de la T ₃ sur les tissus et organes	Détection d'une activité agoniste, antagoniste	Spécifique à un unique MOA	(OECD, 2012)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vitro</i>	Dendritic Arborization	Culture primaire de cellules de Purkinje de souris	Extension TH-dépendante des dendrites de cellules de Purkinje	Effet de la T ₃ sur le développement cérébral	Ciblage d'un type de perturbation de la fonction thyroïdienne	Culture primaire ; Test long et fastidieux	(OECD, 2012)
<i>In vitro</i>	Neurite extension	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>): culture primaire de cellules granulaires cérébelleuses	Extension et élongation des cellules granulaires cérébelleuses TH-dépendantes	Effet de la T ₃ sur le développement cérébral	Ciblage d'un effet de la perturbation de la fonction thyroïdienne	Culture primaire, Test long et fastidieux, Lecture en temps réel en microscopie optique	(OECD, 2012)
<i>In vitro</i>	Neural cell proliferation assay	Humain : culture primaire de cellules neurales de progéniteurs (hNPCs)	Prolifération, migration, et différenciation des hNPCs TH-dépendantes ??? ??	Effet de la T ₃ sur le développement cérébral	Ciblage d'un effet de la perturbation de la fonction thyroïdienne, cellules humaines	Culture primaire ; Test long et fastidieux	(OECD, 2012)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vivo</i>	Flounder metamorphosis assay	Flétan (mettre nom latin comme pour les autres exemples)	Un grand nombre de changements peuvent servir de marqueur (e.g. migration des yeux, asymétrie de la pigmentation, formation de l'estomac)	morphogenèse normale, accélérée ou retardée de la larve au juvénile		Absence de pertinence pour les autres taxons. Cet essai nécessite l'approfondissement des connaissances de la métamorphose du flétan pour être standardisé	(OECD, 2006)
<i>Ex vivo</i>	TH effect on fin-ray resorption	(<i>Xenopus laevis</i>) (têtard)	Résorption de queues de têtards en culture	Résorption TH-dépendante	Facile	Test long (7-8 jours) ; Evaluation uniquement de l'effet des TH	(Hinther et al., 2009)

Type	Nom du test	Espèces	Evènements cibles explorés	Mécanismes de perturbation suivis, en relation avec la fonction thyroïdienne	Avantages	Inconvénients	Commentaires
<i>In vivo</i>	Prolifération des cellules épithéliales dans l'estomac en développement	Flétan (mettre nom latin comme pour les autres exemples)	Développement de l'estomac TH-dépendant	Prolifération des cellules épithéliales dans l'estomac en développement	Multiplication d'un facteur 5 à 10 de la prolifération cellulaire après 48h d'exposition à la thiourée	Test à développer; non mécanistique	Prometteur seulement (OECD, 2006) soffientino & specker 2001-2003
<i>In vitro</i>	<i>Xenopus</i> Gene Expression Assay (NF stage 50/51)	<i>Xenopus laevis</i>	Expression des ARNm de TR β (24h)	Induction ou répression de l'expression des ARNm de TR β	sensibilité ; biomarqueur moléculaire	Marqueur unique; absence de pertinence vis-à-vis des effets morphologiques ; absence de pertinence vis-à-vis des autres taxons, en particulier les mammifères	Traduit de : (OECD, 2006)

